

Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik in Marburg
ehem. kommiss. Direktor Prof. Dr. med. J. HAMM

Untersuchungen über den Austritt
von Zell-Enzymen
aus der akut oder chronisch vorgeschädigten,
isolierten, perfundierten Ratten-Leber

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Klaus Wrogemann
aus Berlin

Marburg 1966

Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik in
Marburg
ehem. kommiss. Direktor Prof. Dr. med. J. Hamm

Untersuchungen über den Austritt von Zell-Enzymen
aus der akut oder chronisch vorgeschädigten,
isolierten, perfundierten
Ratten-Leber.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktor-
grades der gesamten Medizin der hohen Medi-
zinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Klaus Wrogemann
aus Berlin

Marburg 1965



Angenommen von der Medizinischen Fakultät der
Universität Marburg
am ..02.5.66...

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. O. Braun-Falco

Referent: Prof. Dr. med. F. W. Schmidt

Correferent: Prof. Dr. med. W. Löhr...

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	4
B. Abkürzungen	8
C. Material	9
D. Methode	
1. Vergiftungen	9
2. Perfusion	9
3. Entnahme der Untersuchungsproben	10
4. Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials	11
5. Bestimmungsmethoden	12
6. Korrekturfaktoren für den "Soforteffekt" und die "Alterung" im Perfusionsmedium	15
E. Ergebnisse	
1. Histologische Veränderungen der Leber durch die Intoxikation	20
2. Substratspiegel im Perfusionsmedium	21
3. Veränderungen der Enzym-Aktivitäten in der Leber durch die Vergiftungen	25
4. Veränderungen der Enzym-Aktivitäten in der geschädigten Leber während der Perfusion	28
5. Veränderungen der Aktivitäten der Isoenzyme von GOT und MDH bei den verschiedenen Schäd- igungen der Leber und während der Perfusion	31
6. Enzym-Austritt in das Perfusionsmedium	34
7. Isoenzym-Relationen im Perfusionsmedium	39
F. Diskussion	42
G. Zusammenfassung	66
H. Literaturverzeichnis	68



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554417_0065

Einleitung

Es ist ein bekanntes Phänomen, daß bei Schädigungen die Zellen ihre Konzentrationsgradienten zum umgebenden Milieu nicht mehr aufrecht erhalten können (2, 16, 33, 37, 53, 86, 87, 92 - 94), sodaß es zum Austritt von Zellbestandteilen kommt. Unter den austretenden Zellbestandteilen haben die Enzyme aus mehreren Gründen besondere Bedeutung gewonnen:

Oggleich sie ihrer chemischen Natur nach Eiweißkörper sind, lassen sie sich mittels ihrer spezifischen Funktion in außerordentlich geringen Konzentrationen nachweisen, seit der Einführung der optischen Tests nach Warburg (6, 85) ist die Bestimmungsmethode so einfach, daß sich Enzymbestimmungen auch für Serien-Messungen anbieten, und weiterhin gestattet es die Vielzahl von zelleigenen Enzymen, über quantitative Angaben hinaus auch qualitative Aussagen zu machen.

Aus diesen Gründen hat besonders in den letzten zehn Jahren die Bestimmung von Enzymen im Serum eine weite Verbreitung gefunden und ist zu einer klinischen Routinemethode geworden, deren großer diagnostischer Nutzen vor allem auf dem Gebiete der Herz- und Lebererkrankungen gesichert ist. Es hat sich hier ein reicher Erfahrungsschatz angesammelt, der sich in einem umfangreichen Schrifttum widerspiegelt (3, 11, 14, 19, 20, 27, 28, 30, 31, 34, 35, 38, 47, 48, 51, 53, 62, 69 - 71, 74 - 77, 83, 92, 93).

Gleichzeitig wurde versucht, die Hintergründe der empirischen Befunde - z. B. die unterschiedliche Enzym-Konstellation bei Herz- und Lebererkrankungen - experimentell abzuklären (6, 21 - 23, 34, 48, 50, 56, 60, 61, 81, 85).

Bei diesen Studien wurden die Enzymmuster vieler Organe untersucht (11, 19, 68, 77, 88), organspezifische Eigenschaften von Enzymen entdeckt (25, 26, 91), Kenntnisse über die intracelluläre Lokalisation von Enzymen erworben (5, 9, 74, 76), molekular unterschiedliche Formen von Enzymen gleicher katalytischer Funktion, sogenannte Isoenzyme (12, 82, 83, 90) beschrieben und Daten über das Schicksal der Enzyme nach ihrem Verlust aus den Zellen gesammelt (1, 18, 21 - 23, 40, 84).

Aufbauend auf diesen Kenntnissen, und durch die Einführung des Begriffes der "Verzerrung" konnte die Analyse von Enzymmustern im Serum verfeinert werden, da Grad und Art der Abweichung der extracellulären von den intracellulären Enzymmustern Rückschlüsse auf die Schwere und die Ablaufgeschwindigkeit der Schädigung eines bestimmten Organs zulassen (27, 71, 75, 77).

Trotz dieser Fortschritte bleibt die Bedeutung mancher Enzym-Relationen häufig noch unklar. Nur sehr grob - in deutlichem Mißverhältnis zu der großen Sensibilität und Spezifität der verwandten Methoden - können wir uns die Differenziertheit des Phänomens Enzym-Austritt bisher diagnostisch nutzbar machen.

Einen Beitrag zur Lösung der zahlreichen hier noch offenen Fragen zu leisten, war das Ziel dieser Arbeit. Als Versuchsobjekt wurde die Leber gewählt, über die ja auch klinischerseits die umfangreichsten und differenziertesten Untersuchungen über den Austritt von Zell-

Enzymen bei akuten und chronischen Erkrankungen vorliegen und deren Enzym-Muster und seine Veränderungen unter Schädigungen bereits gut untersucht sind.

Nachdem frühere Untersuchungen (80) gezeigt hatten, daß das unter hypoxischer Leberschädigung extra-cellulär auftretende Enzym-Muster aufgrund der Konzentrationsgradienten, Molekulargewichte und der intracellulären Lokalisation der einzelnen Enzyme zufriedenstellend erklärt werden kann, sollte geprüft werden, ob durch eine akute oder chronische Vorschädigung des Organs die Art des Enzym-Austrittes verändert wird.

Um den Zufälligkeiten spontaner Krankheitsverläufe auszuweichen, wurde das Tierexperiment gewählt. Nervale und hormonelle Einflüsse auf die Leber wurden durch die Isolierung des Organs ausgeschaltet. Die Wahl des Modells - die isolierte, perfundierte, überlebende Rattenleber - empfahl sich auch durch die zahlreichen Bezugsdaten, die hierüber schon bekannt sind (2, 6, 29, 41, 42, 43, 50, 57 - 61, 81), speziell auch über den Austritt von Enzymen bei Perfusion der isolierten Leber mit verschiedenen Medien, auch unter Zusatz stoffwechseltoxischer Substanzen zur Perfusionsflüssigkeit (44, 45).

Um diese letzten Untersuchungen als Vergleichsbasis heranziehen zu können, wurde auch in den im Folgenden beschriebenen Experimenten die Leber mit einem Erythrozyten-freien Medium perfundiert. Die hierbei eintretende hypoxische Schädigung diente als Starter des Enzym-Austritts aus der in vivo mit CCl_4 oder TAA akut oder mit TAA chronisch vorgeschädigten Leber.

Untersucht wurden die Veränderungen des Musters von 17 Hauptketten-Enzymen und der Isoenzyme von MDH und GOT in der Leber während der Vergiftung und der 4-stündigen Perfusion, sowie der Austritt dieser Enzyme in den Kreislauf während der Perfusion.

Abkürzungen

ADH	= Alkohol-Dehydrogenase
ALD	= Fructose-1,6-Diphosphat-Aldolase
ENO	= Enolase
GAPDH	= Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GDH	= α -Glycerophosphat-Dehydrogenase
GLDH	= Glutamat-Dehydrogenase
GOT	= Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	= Glutamat-Pyruvat-Transaminase
ICDH	= Isocitrat-Dehydrogenase
LDH	= Lactat-Dehydrogenase
MDH	= Malat-Dehydrogenase
PFA	= Fructose-1-Phosphat-Aldolase
PGDH	= 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
PGK	= Phosphoglycerat-Kinase
PK	= Pyruvat-Kinase
SDH	= Sorbit-Dehydrogenase
TIM	= Triose-Isomerase
ZF	= Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Zwischenferment)

ADP	= Adenosin-Diphosphat
ATP	= Adenosin-Triphosphat
AT	= Albumin-Tyrode-Lösung
EDTA	= Äthylendiamintetraacetat
FDP	= Fructose-1,6-Diphosphat
G-6-P	= Glucose-6-Phosphat
GSH	= reduziertes Glutathion
NADH	= reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	= reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid- Phosphat
6-PG	= 6 Phosphogluconat
PGS	= Phosphoglycerat
TRAP	= Triäthanolamin-Puffer
P-P	= Phosphat-Puffer

C-Raum = cytoplasmatischer Raum

M-Raum = mitochondrialer Raum

Material:

Es wurden männliche Inzucht-Ratten eines Wistar-Stammes benutzt mit einem Körpergewicht von 200 - 300 g. Am Ende der chronischen Intoxikation betrug das Gewicht etwa 300 g.

F u t t e r : Latz-Standard-Kost. 12 Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Tieren die Nahrung entzogen, jedoch Wasser ad libitum weiter gegeben.

Methode

1.) Vergiftungen:

a) akute CCl_4 -Vergiftung:

24 Std. vor Perfusionsbeginn wurde den Tieren 0,03 ml CCl_4 / 100 g Körpergewicht 1: 1 verdünnt mit Paraffinum liquidum intraperitoneal verabreicht.

b) akute Thiocetamid-Vergiftung:

24 Std. vor Perfusionsbeginn wurde den Ratten 20 mg TAA / 100 g Körpergewicht als 2 %ige wässrige Lösung intraperitoneal gegeben.

c) chronische Thioacetamid-Vergiftung:

Dem Trinkwasser, das ad libitum zur Verfügung stand, wurde TAA-Lösung zugesetzt. Thioacetamid-Konzentration im 1. Monat 0,01 %, darauf 6 Monate 0,02 %, in den letzten 2 Monaten 0,04 %. Gesamtdauer der Intoxikation 9 Monate.

2.) Perfusion:

a) Isolierung der Leber:

Äther-Narkose. Injektion von 0,4 ml Heparin (Liquemin^R) in die Vena Femoralis. Resektion des Lobus caudatus der Leber. Kanulierung der Vena portae und der Vena cava caudalis bis oberhalb der Einmündung der Lebervenen. Abbindung der Vena cava caudalis unterhalb der Einmündung der

Lebervenen sowie der Arteria hepatica. Herausnahme und Wägung der Leber. Zeitdauer der Isolierung von der Kanulierung der Vena portae bis zum Anschluß an den Perfusions-Kreislauf: 3 1/2 - 5 Minuten.*

b) Leber-Perfusion:

Apparatur nach den Angaben von Schimmassek (57) in Anlehnung an die Methode von L.L. Miller (41): geschlossenes System, Gesamt-Apparatur in temperierter, feuchter Kammer. Förderung der Perfusionslösung über Rollpumpe. Oxygenierung mit Carbogen im Gegenstrom über Kugelkühler, nachfolgend zusätzliche Feintemperierung des Perfusionsmediums im Schlangenkühler. Nach Durchströmung der Leber Sammlung des aus der Vena cava ausströmenden Perfusionsmediums unter Rühren im Vorratsgefäß.

Volumen des Perfusionsmediums 175 ml. Durchfließgeschwindigkeit 2 - 6 ml pro Min./g Leber. Hydrostatischer Druck 160 mm H₂O. Temperatur 37°C. Dauer der Perfusion 4 Stunden.

c) Perfusionsmedium Albumin-Tyrode-Lösung (AT):

25 g Serum-Albumin vom Rind, reinst (Behring-Werke, Marburg), 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g CaCl₂, 0,1 g MgCl₂ (·6 H₂O), 0,12 g Na₂HPO₄ (·2 H₂O), 0,92 g Glucose, 0,15 g Na-Lactat, 0,01 g Na-Pyruvat ad 1000 ml H₂O. pH 7,3.

3.) Entnahme der Untersuchungsproben:

a) Leber:

Vor Perfusionsbeginn wurde der Lobus caudatus und nach dem Ende der Perfusion ein entsprechend großer

*Für die Durchführung der Isolierung der Lebern danke ich Herrn Dr. Ch. Herfarth, Chir. Univ.-Klinik, Marburg/Lahn.

Anteil aus der Mitte des Lobus sinister zur Bestimmung des Enzym.-Musters und zur histologischen Untersuchung entnommen. Die Vergleichbarkeit der Enzym-Muster der verschiedenen Leberlappen wurde durch frühere Untersuchungen gesichert (79).

b) Perfusions-Lösung zur Enzym- und Substratbestimmung:

Aus dem gerührten Vorratsgefäß erfolgten Abnahmen von je 10 ml 3 - 5 Min., 1 Std., 2, 3, und 4 Std. nach Perfusionsbeginn (kein Ersatz der Entnahmen).

4.) Aufbereitung des Untersuchungs-Materials:

a) L e b e r zur Enzym- und Isoenzym-Bestimmung:

Die Proben wurden in 0,04 ml eiskalter 0,15 M NaCl-Lösung / mg Frischgewicht 2 Min. im Ultra-Turrax* unter Eis-Salzkühlung homogenisiert, nach halbstündigem Stehen bei + 4° C bei gleicher Temperatur und 28 000 g 20 Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand dekantiert und bis zu der am gleichen Tag erfolgten Messung im Kühlschrank oder Eisbad aufbewahrt. Zur Isoenzymbestimmung Dialyse des Homogenat-Überstandes über Nacht gegen 0,008 M Phosphat-Puffer pH 7,0.

b) L e b e r zur morphologischen Untersuchung:

Die Proben wurden in Formalin fixiert und in üblicher Weise aufgearbeitet.**

* Firma Janke & Kunkel, Staufen/Breisgau.

** Die Anfertigung der histologischen Präparate und ihre Beurteilung verdanke ich Herrn Dr. K. OPITZ, Path. Institut des Stadtkrankenhauses Kassel.

c) Perfusionslösung zur Enzym- und Isoenzym-Bestimmung:
Die Proben wurden zur Entfernung der wenigen aus der Leber herausgespülten Erythrozyten und Leukozyten 10 Min. bei + 4°C und 3 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Messung am gleichen Tag im Eisbad aufgehoben. Zur Isoenzym-Bestimmung Dialyse über Nacht gegen 0,008 M Phosphat-Puffer, pH 7,0.

d) Perfusionslösung zur Substratbestimmung:
Enteiuweissung unmittelbar nach Entnahme für Lactat und Pyruvat mit gleichen Mengen, für Glucose mit dem 9- fachen Volumen eiskalter 0,33 M Perchlorsäure. Neutralisieren mit KOH. Abzentrifugierung vom Niederschlag bei + 4°C und 3 000 g für 5 Minuten. Dekantieren der enteiuweissten Überstände! Bestimmung am gleichen Tag.

5.) Bestimmungsmethoden:

a) Enzym-Aktivitäts-Bestimmungen:

Optischer Test nach Warburg; Photometer EPPENDORF, Wellenlänge 366 m μ , Messtemperatur 25°C. Gesamt-Testvolumen 1 ml, pH 7,5 (die Bestimmungen erfolgten - abgesehen von den eingesetzten Probenvolumina - im Medium, in der Leber und in den Eluatzen der Säulen-chromatographie in gleichen Ansätzen).

Endkonzentrationen im Test in mM:

- LDH : NADH 0,2 mM; TRAP 50 mM; Pyruvat 2,0 mM.
MDH : NADH 0,2 mM; TRAP 50 mM; Oxalacetat 1,8 mM.
GLDH : NADH 0,15 mM; TRAP 50 mM; EDTA 3,2 mM;
Ammonsulfat 100 mM; α -Ketoglutarat 6,8 mM.
GOT : NADH 0,3 mM; P-P 100 mM; α -Ketoglutarat
7,0 mM; L-Aspartat 50 mM; MDH 14 U/ml.
GPT : NADH 0,3 mM; P-P 100 mM; α -Ketoglutarat
10,2 mM; L-Alanin 84 mM; LDH 7 U/ml.

- ICDH : NADPH 0,5 mM; TRAP 50 mM; EDTA 2,9 mM;
MnCl₂ 10 mM; Isocitrat 1,9 mM.
- ZF : NADPH 0,5 mM; TRAP 50 mM; EDTA 3,5 mM;
G-6-P 0,36 mM.
- PGDH : NADPH 0,5 mM; TRAP 50 mM; EDTA 3,5 mM;
MgCl₂ 10 mM; 6-PG 0,6 mM.
- SDH : NADH 0,2 mM; TRAP 50 mM; Fructose 250 mM.
- ADH : NADH 0,2 mM; TRAP 50 mM; Acetaldehyd 10 mM.
- PFA : NADH 0,2 mM; TRAP 50 mM; Fructose-1-P 12,5 mM;
GDH 3,6 U/ml; TIM 5 U/ml.
- ALD : NADH 0,2 mM; TRAP 50 mM; FDP 1,1 mM; GDH
3,6 U/ml; TIM 5 U/ml.
- GDH : NADH 0,2 mM; TRAP 50 mM; EDTA 3,2 mM; FDP
1,1 mM; ALD 2 U/ml; TIM 10 U/ml.
- GAPDH : NADH 0,25 mM; TRAP 50 mM; EDTA 2,6 mM;
GSH 1,25 mM; MgSO₄ 5 mM; 3-PGS 9,0 mM;
ATP 50 mM; PGK 1,8 U/ml.
- PGK : NADH 0,25 mM; TRAP 50 mM; EDTA 2,6 mM; MgSO₄
7,5 mM; 3-PGS 7,2 mM; GSH 2,5 mM; ATP 20 mM;
GAPDH 1,8 U/ml.
- ENO : NADH 0,3 mM; MgSO₄ 50 mM; KCl 100 mM; ADP
0,86 mM; 2-PGS 1,1 mM; PK 2,5 U/ml; LDH
7 U/ml.
- PK : NADH 0,3 mM; TRAP 50 mM; EDTA 2,6 mM;
MgSO₄ 50 mM; KCl 100 mM; Phosphoenol-Pyruvat
2,5 mM; ADP 1,0 mM; LDH 7 U/ml.

b) Isoenzym-Trennung

Säulenchromatographie an DEAE-Sephadex nach (46):

Säulen: Länge 8 cm, Durchmesser 0,8 cm, Höhe mit
aufgesetztem Vorratsgefäß 23 cm.

Säulen mit einem Eiswasser-durchströmten Mantel
gekühlt.

Füllung: 280 mg DEAE-Sephadex A 50 medium.

- 2 Elutionslösungen: 1. 0,008 M Phosphat-Puffer, pH 7,0
2. 0,2 M Phosphat-Puffer, pH 7,0 +
0,2 M NaCl

Elutionsvolumina: 4 Fraktionen à 3 ml = 12 ml Lösung 1

6 Fraktionen à 5 ml = 30 ml Lösung 2

Elutionsdauer ca. 4 Stunden.

Wie an DEAE-Cellulose (55, 72), werden auch an DEAE-Sephadex (46) die Cytoplasmatischen Isoenzyme von GOT und MDH adsorbiert, die mitochondrialen jedoch nicht. Dadurch erhält man bei der Chromatographie 2 getrennte Gipfel, die den Isoenzymen des mitochondrialen und cytoplasmatischen Raumes entsprechen. Die gleichen Gipfel erhält man einzeln, wenn man durch fraktionierte Extraktion nach (13) gewonnen M- und C-Raum getrennt aufträgt. Dank der hohen Adsorptionskapazität des DEAE-Sephadex ist das Elutionsverfahren mit Kurzsäulen und nur 2 verschiedenen Elutionsmitteln gegenüber gebräuchlichen kontinuierlichen und diskontinuierlichen Elutionsverfahren sehr vereinfacht. Trotzdem zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung (46) mit anderen Trennverfahren, wie fraktionierter Extraktion nach Bücher (13), Chromatographischer Trennung durch 45 cm DEAE-Cellulose-Säulen mit kontinuierlicher Elution (67) oder durch 8-cm-DEAE-Cellulose-Säulen mit 4 Elutionsmitteln (55).

c) Substratbestimmung:

Lactat und Pyruvat wurden enzymatisch mittels der Test-Kombination der Fa. Boehringer bestimmt; Glucose ebenfalls enzymatisch nach der Methode von Czok und Barthelmai (4). Das Fehlen korpuskulärer Elemente wurde bei der Berechnung berücksichtigt.

d) Proteinbestimmung:

Biuret-Methode nach T. E. Weichselbaum (89).

6.) Korrekturfaktoren für den "Soforteffekt" und die "Alterung" im Perfusionsmedium

Es ist bekannt, daß Änderungen der Enzymaktivitäten im Serum (hier Perfusionsmedium) mit zur Verzerrung des Musters gegenüber dem des Ursprungsorganes beitragen (1, 18, 21 - 23, 40, 84). Dabei zeigt sich in vitro eine schnelle Phase der Aktivitätsänderung, fortan als "Soforteffekt" bezeichnet, und eine langsame, von nun an als "Alterung" bezeichnet, E. Schmidt und F.W. Schmidt (78, 79) untersuchten in ausgedehnten Versuchsreihen den Einfluß verschiedener Faktoren auf diese beiden Phasen für jedes einzelne der 17 Enzyme.

- a) Für den Soforteffekt, definiert als Änderung der Enzymaktivität im Medium innerhalb der ersten 5 Min. (78), zeigte sich dabei, daß der sehr wirksame Faktor der Verdünnung sich einer genaueren Korrektur entzieht, da sich die Verdünnung während der Perfusion fortlaufend ändert. Als grobe Annäherung wurden zur Berechnung der Aktivitätsänderungen durch den Soforteffekt im Perfusionsmedium die Werte verwandt, die Schmidt und Schmidt bei ihren Versuchen, von einem 12 %igen Leberhomogenat ausgehend, für eine Verdünnung von 1:10 fanden. (Werte in Tab.I,a).
- b) Bei der Alterung versprach der lineare Verlauf der Veränderungen der Enzymaktivitäten bei logarithmischer Auftragung über der Zeit, daß hier der Aktivitäts-Zeit-Beziehung ein exponentielles Gesetz zugrunde liege.*

*Die Berechnung der Alterung führte Dr. K.H. Dettmar, Farbenfabriken Bayer, Leverkusen, aus, dem ich mich zu großem Dank verpflichtet fühle.

Diese Annahme wurde statistisch mit Hilfe der Größe F überprüft (39):

$$F = \frac{\sum_{i=1}^n y_i^2}{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

n = Anzahl der Meßwerte

y_i = Logarithmus des i -ten Meßwertes

$\bar{y}$ = der zu y_i gehörende Wert der logarithmischen Ausgleichsgeraden.

In unserem Fall ($n = 3$) ergibt sich bei Zugrundelegung einer Wahrscheinlichkeit von 95 % für F ein Wert kleiner als 18,5, wenn die Voraussetzung für einen exponentiellen Verlauf nicht gegeben ist. Keinen exponentiellen Verlauf zeigten die Veränderungen der Aktivitäten von: ALD und ENO.

Der Verlauf der Alterung ist durch die Neigung der Ausgleichsgeraden für die Meßwerte charakterisiert. Bezeichnen wir die zur Zeit t in der Verdünnung gemessene Aktivität mit $E_A^*(t)$, so ergibt sich für die auf den Ausgangswert $E_A^*(0)$ bezogene Aktivität $f(t) = E_A^*(t)/E_A^*(0)$, bei der Darstellung im dekadischen Logarithmus

$$\log f(t) = t \quad \text{oder} \quad f(t) = 10^{-\beta t}$$

oder im natürlichen Logarithmus

$$\ln f(t) = \alpha t \quad \text{oder} \quad f(t) = e^{-\alpha t}$$

wobei $\alpha = 2,3 \beta$ ist.

(Dabei ist $\alpha, \beta > 0$ bei Abnahme und $\alpha, \beta < 0$ bei Zunahme der Enzymaktivität während des Verlaufs der Alterung.)

Der für die Alterung der einzelnen Enzyme in AT als Verdünnungsmedium charakteristische Exponent α läßt sich in der angedeuteten Weise graphisch annähernd be-

stimmen. Wegen der Streuung der Meßwerte (Mittelwerte aus jeweils 4 bis 8 Bestimmungen) ist jedoch die Festlegung der Ausgleichsgeraden in manchen Fällen schwierig. Wir bevorzugen daher die rechnerische Ermittlung von α . Hierzu bietet sich die Methode der kleinsten Fehlerquadrate an:

$$\sum_{i=1}^n (\text{Fehler})_i^2 = \sum_{i=1}^n (\log f(t_i) + \beta t_i)^2 = \text{Minimum},$$

woraus

$$= - \frac{\sum_{i=1}^n t_i \cdot \log f(t_i)}{\sum_{i=1}^n t_i^2}$$

und

$$\alpha = 2,3 \beta$$

folgen.

Die Kenntnis des Exponenten α (Tab. I, b) ermöglicht die Korrektur der Veränderungen der Enzymaktivitäten durch die Alterung während der Perfusionsdauer: Bezeichnen wir mit $E(t)$ die Enzymaktivität, die im Perfusionskreislauf zur Zeit t meßbar wäre, wenn sie keinen Veränderungen durch die Alterung unterliegen würde, mit $E_A(t)$ die tatsächlich im Kreislauf zur Zeit t gemessene Aktivität und mit $f(t)$ das Alterungsgesetz (s. o.), so läßt sich die Beziehung

$$(1) \quad E_A(t) = f(T) E(0) + \int_0^T f(T-t) \frac{dE(t)}{dt} dt$$

aufstellen. Liegt, wie in unserem Fall, ein exponentielles Alterungsgesetz

$$f(t) = e^{-\alpha t}$$

vor, so erhalten wir durch Auflösung der Gleichung (1) nach $E(t)$ die Umrechnungsformel

$$(2) \quad E(T) = E_A(T) + \alpha \int_0^T E_A(t) dt$$

für die praktische Auswertung wird die Integralbezeichnung (2) durch die Summenformel

$$(3) \quad E(T_1) = E_A(T_1) + \alpha \sum_{k=1}^1 \Delta F_k$$

mit

$$(4) \quad \Delta F_1 = \int_{T_{1-1}}^{T_1} E_A(t) dt \approx \frac{1}{2} (T_1 - T_{1-1}) (E_A(T_1) + E_A(T_{1-1}))$$

ersetzt. Nach diesen Formeln lassen sich die gemessenen Werte

$$E_A(T_1), E_A(T_2), E_A(T_3), \dots$$

in die gesuchten Aktivitätswerte

$$E(T_1), E(T_2), E(T_3), \dots$$

umrechnen.

Entsprechend obigem Ansatz wurde aus den während der Perfusionsdauer gemessenen Werten von $E_A(T_1)$ und mit der Alterungskonstante α $E(T_1)$ bestimmt. Damit konnte der Einfluß der Alterung auf die Enzymaktivität während der Perfusionsdauer weitgehend zurückgerechnet werden. Zur Korrektur des Soforteffektes wurde $E(T_1)$ dann jeweils mit dem reziproken Wert der prozentualen Aktivitätsänderung während dieser Phase multipliziert. Eine wesentliche Änderung der Isoenzymrelationen von GOT und MDH während der für die Chromatographie notwendigen Dialyse trat nicht auf (78) und brauchte daher nicht berücksichtigt zu werden.

Tabelle I

a.) Sofort-Effekt bei 37°C.

Enzym-Aktivitäten nach 5 min. in % der Theorie.

Verdünnung 1 : 10 in AT.

b.) Alterungs-Konstante in AT bei 37°C.

Enzym	a.)	b.)
ADH	84	0,0317
ALD	108	0,0294
ENO	105	-0,2548
GAPDH	33	0,4727
GDH	140	-0,0743
GLDH	111	0,1119
GOT	72	-0,0266
GPT	141	-0,0198
ICDH	113	0,1497
LDH	118	-0,0171
MDH	129	-0,0862
PFA	142	0,0373
PGDH	132	0,1250
PGK	96	0,3265
PK	76	0,0446
SDH	106	0,0648
ZF	88	0,4014

Ergebnisse:

1.) Histologische Veränderungen der Leber durch die Intoxikationen:

Die akut vergifteten Tiere waren am Versuchstag apathisch und struppig. Eine Peritonitis war weder nach Verabreichung von CCl_4 noch von TAA zu beobachten. Die histologischen Untersuchungen der Leber zeigten bei der akuten CCl_4 -Vergiftung folgendes Bild:

Regelrechter Läppchenbau bei engen Sinuoiden. Frischer, ausgeprägter mittelgroßherdiger Parenchymzellschaden vorwiegend in den Läppchenzentren bis in die Intermediärzonen reichend, nicht aber in der Läppchenperipherie (Plasma-Eosinophilie, Plasma-Granulierung, Auflösung der Zellkonturen, Kernpyknose, Chromatolyse). In diesen Bezirken waren sowohl kleinherdige Nekrosen als auch Inseln von Zellen ohne erkennbaren Schaden nachzuweisen, auch vielkernige Leberzellen und sogenannte "helle Zellen". Deutliche fein- bis mittelgrob-tropfige Verfettung der Leberzellen ohne Bevorzugung bestimmter Läppchenareale. Mäßig viel feines Eisen in den Parenchym- und Sternzellen. Geringe Sternzellreaktion.

Das histologische Bild bei akuter TAA-Vergiftung zeigte ebenfalls einen regelrechten Läppchenaufbau bei normaler Weite der Sinusoide. Der kräftig ausgeprägte Parenchymzellschaden war hier nur im engeren Läppchenzentrum nachzuweisen. Hier kamen auch Nekrosen vor, dabei deutliche Sternzellaktivierung und auffallend zahlreiche eosinophile polymorphkernige Leukozyten. Die Verfettung der Leberzellen war geringer als bei der akuten CCl_4 -Vergiftung. "Helle Zellen" wurden nicht beobachtet, auch keine verstärkte Eisenablagerung.

Bei der chronischen TAA-Vergiftung ging ein Teil der Tiere ein, besonders in den letzten 8 Wochen der Behandlung. Stichproben zeigten, daß hier nach dem makroskopischen Bild eine Lebercirrhose vorlag. Einige überlebende Tiere zeigten nur geringe makroskopische Veränderungen an der Leber im Sinne einer Verfettung. Die drei zur Perfusion verwandten Tiere hatten eine klein-knotige Lebercirrhose. Die Lebern waren leichter als bei normalen Tieren (8 - 9 g). Bei zweien dieser Tiere fiel eine ausgeprägte portale Hypertension auf.

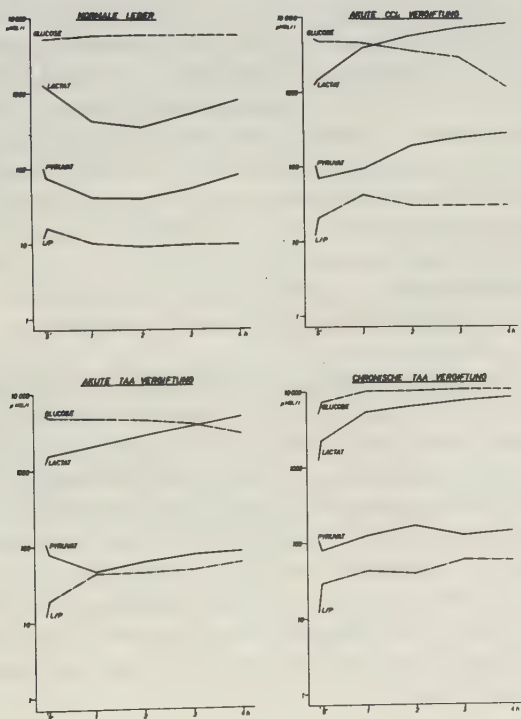
Histologisch fand sich ein ausgeprägter pseudolobulärer Parenchyumbau zu einer kompletten Cirrhose. Die Pseudoläppchen waren meist relativ scharf begrenzt, das vermehrte Bindegewebe dichtzellig mit Lymphozyten, Plasmazellen und spärlichen Granulozyten infiltriert. In den Bindegewebsstraßen lagen kleine unregelmäßige Leberzellgruppen und Einzelzellen, die ebenso wie die Zellen in den Pseudoläppchen häufig Parenchymschädigungen erkennen ließen. In unregelmäßiger Verteilung fand sich in den Leberzellen fein- bis mittelgrob-tropfiges Fett. Das Sternzellsystem war mäßig aktiviert.

2.) Substratspiegel im Perfusions-Medium:

Die als Indizien für den Stoffwechselzustand der Leber gemessenen Spiegel von Glucose, Lactat und Pyruvat im Perfusionsmedium zeigt die Abbildung 1 für die drei Vergiftungen im Vergleich zur normalen Leber.

Abb. 1

Substratspiegel und Lactat/Pyruvat-Quotient im Perfusionsmedium während der Perfusion in $\mu\text{M}/1$.



Während die normale Leber den Glukose-Spiegel im Medium wie auch den Lactat/Pyruvat-Quotienten trotz einer passageren Senkung von Lactat und Pyruvat auf normalen Werten konstant hält, ist dies den vorgeschädigten Lebern offenbar nicht mehr möglich.

Bei der akuten CCl_4 -Vergiftung sinkt der Glukose-spiegel im Laufe der 4 Stunden auf weniger als ein Viertel des Ausgangswertes ab. Der Abfall ist ab der 1. Stunde praktisch linear. Gleichzeitig steigt das Lactat auf das 7-fache des Ausgangswertes an. Auch dieser Verlauf ist ab der 1. Stunde nahezu linear. Der Pyruvat-Spiegel fällt in der 1. Stunde auf zwei Drittel der Ausgangskonzentration ab, um dann bis zur 4. Stunde auf das 3-fache des Ausgangswertes anzusteigen. Es resultiert ein Anstieg des Lactat-Pyruvat-Quotienten bis zum Ablauf der 1. Std. auf über 40. In der 2. Stunde fällt er auf 30 ab und hält dann diesen Wert, da sich die Konzentrationsänderungen von Pyruvat und Lactat in den letzten beiden Perfusionsstunden parallel bewegen.

Bei der akuten TAA-Vergiftung sind die Veränderungen der Substrat-Spiegel dem der akuten CCl_4 -Vergiftung ähnlich, aber von deutlich geringerem Ausmaß. Der Glukose-Spiegel sinkt im Laufe der 4-stündigen Perfusion nur auf etwa die Hälfte der Ausgangs-Konzentration ab. Der Lactat-Spiegel steigt auf das 4-fache des Ausgangswertes an. Das Pyruvat fällt bis zum Ablauf der 1. Std. stärker ab als bei der CCl_4 -Vergiftung - auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes - und erreicht auch nach 4 Std. erst wieder 80 % des Wertes vor Perfusionsbeginn.

Dadurch wird der L/P-Quotient weiter angehoben: Nach dem raschen Anstieg im Verlauf der 1. Stunde nimmt sein Wert weiter langsam zu, um am Ende der Perfusion über 60 zu liegen, also doppelt so hoch wie am Ende der Perfusion der akut mit CCl_4 geschädigten Leber.

Bei der chronischen TAA-Vergiftung steigt der Glukose-Spiegel sofort nach Perfusionsbeginn und weiter bis zum Ende der 1. Stunde auf etwa das Doppelte des Ausgangswertes an. Hier hält er sich konstant bis zum Ende der Perfusion. Auch die Lactat-Konzentration steigt in der 1. Stunde steil, dann langsamer an und erreicht mit nahezu $800 \text{ } \mu\text{g/ml}$ einen enorm hohen Wert nach 4 Stunden. Der Pyruvat-Spiegel zeigt nach einer anfänglich geringen Depression keinen weiteren Abfall mehr, sondern schwankt im weiteren Verlauf um gering erhöhte Werte zwischen 11 und $15 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Auf diese gering erhöhte Pyruvat-Konzentration ist zurückzuführen, daß trotz des hohen Lactat-Anstiegs der L/P-Quotient keine anderen Werte zeigt als bei der akuten TAA-Vergiftung. Er steigt in den ersten 2 Std. auf Werte um 40, danach hält er sich bei 60.

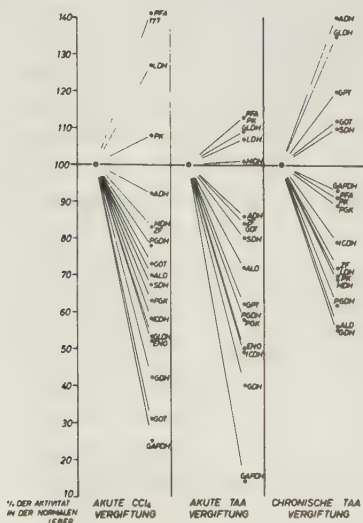
Bei allen 3 Vergiftungsformen findet sich also ein erheblicher Lactat-Anstieg mit entsprechender Änderung des L/P-Quotienten, der bei der Perfusion der normalen Leber nicht nachweisbar ist. Deutliche Unterschiede finden sich auch im Verhalten des Glukose-Spiegels, der sich bei der akuten Form sozusagen "hypo=" bei der chronischen Schädigung "hyperglykämisch" verändert.

3.) Veränderungen der Enzym-Aktivitäten in der Leber durch die Vergiftungen:

Im Laufe der akuten oder chronischen Zellschädigung bei der Vergiftung mit CCl_4 oder TAA verändert sich auch das Enzym-Muster der Leber in deutlicher und verschiedenartiger Weise. Die gemessenen Werte sind in Abbildung 2 und Tab. II zusammengestellt.

Abb. 2

Veränderungen der Enzym-Aktivitäten in der Leber durch die Vergiftungen in % der Aktivität in der normalen Leber.



Tab. II

Enzym-Aktivitäten in der normalen und der vorgeschädigten
Rattenleber (Mittelwerte in U/g Leber).

Enzym	Normal n = 20	ak. CCL ₄ % n = 5 der Norm	ak. TAA % n = 4 der Norm	chron. TAA % n = 3 der Norm
ADH	20,51	18,90 92	17,69 86	28,67 140
ALD	8,25	5,81 70	5,93 72	4,60 56
ENO	7,19	3,75 52	3,63 50	6,54 91
GAPDH	105,57	26,40 25	15,15 14	98,57 93
GDH	34,84	14,66 42	13,93 40	19,31 55
GLDH	44,10	23,27 53	48,30 109	59,43 135
GOT	108,13	79,30 73	90,90 84	121,60 112
GPT	14,80	4,57 31	9,21 62	17,77 120
ICDH	19,17	11,15 58	9,45 49	15,23 79
LDH	344,68	437,50 127	369,60 107	242,40 70
MDH	377,38	314,50 83	379,90 101	260,58 69
PFA	6,65	11,75 177	7,51 113	6,06 91
PGDH	2,30	1,79 78	1,33 58	1,43 62
PGK	155,43	97,60 63	89,90 58	138,57 89
PK	23,44	25,30 108	26,40 113	16,36 70
SDH	16,35	11,02 67	13,09 80	17,93 110
ZF	3,81	3,18 83	3,21 84	2,74 72
Extract- Protein mg/g	128,13	100,00 78	115,00 90	99,00 77

Die Werte zeigen, daß, wie zu erwarten, wesentlich häufiger Aktivitäts-Abnahmen als -Zunahmen bei allen drei Vergiftungen gefunden werden.

Bei der akuten CCl₄-Vergiftung finden sich Aktivitäts-zunahmen nur bei PFA, LDH und PK. Die stärksten Abnahmen zeigen GAPDH, GPT und GDH (oft weniger als 50 %). In weiter Streuung finden sich bei den weiteren Enzymen Aktivitäts-Verminderungen zwischen 8 - 48 %.

Bei der akuten TAA-Vergiftung zeigen wiederum PFA, PK und LDH eine hier geringere Aktivitäts-Zunahme. Eigentümlicherweise auch hier die GLDH. Die stärksten Aktivitäts-Einbußen erleidet auch hier die GAPDH, gefolgt von der GDH. Die Verminderung der Aktivitäten anderer Enzyme schwankt auch hier zwischen 15 und 50 %.

Bei der chronischen TAA-Vergiftung sind die Aktivitäts-Zunahmen deutlicher und betreffen hier auch andere Enzyme als bei den akuten Vergiftungen, nämlich ADH, GPT, GOT, SDH und - wie bei der akuten TAA-Vergiftung - die GLDH. Am stärksten vermindert ist hier die GDH mit nur noch 55 % und die ALD mit 56 % der Norm. Ganz allgemein sind die Aktivitätsabnahmen geringer als bei den akuten Vergiftungen.

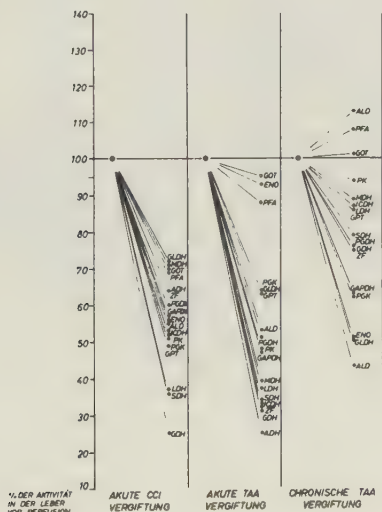
Auch der Gehalt der Leber an Extrakt-Protein wird geringer. Von dem Durchschnittswert der Norm: 128 mg/g Frischgewicht sinkt er in praktisch gleichem Ausmaß bei der akuten CCl₄ und der chronischen TAA-Vergiftung auf 77 bzw. 78 % der Norm. Deutlich geringer ist er mit nur 10 % Einbuße bei der akuten TAA-Vergiftung.

4.) Veränderungen der Enzym-Aktivitäten in der geschädigten Leber während der Perfusion.

Die bereits deutlich von der Norm abweichenden Enzym-Relationen der geschädigten Leber werden durch die Perfusion des isolierten Organs mit einem erythrozytenfreien nur physikalisch mit Sauerstoff gesättigten Medium weiter verändert. Wie zu erwarten und in Abbildung 3 und Tab. III im einzelnen dargestellt, tritt hierdurch überwiegend eine Verminderung der Enzymaktivitäten ein.

Abb. 3

Veränderungen der Enzym-Aktivitäten in der geschädigten Leber während der Perfusion in % der Aktivität in der Leber vor Perfusion.



Tab. III

Enzym-Aktivitäten in der vorgeschädigten Leber vor und nach Perfusion.

Medium: AT, Dauer: 4 Stunden, Temperatur: 37°C.

Enzym	ak. CCl ₄ n = 3		ak. TAA n = 2		chron. TAA n = 3	
	vor Perf.	nach Perf.	vor Perf.	nach Perf.	vor Perf.	nach Perf.
ADH	18,90	12,10	1769	4,48	28,76	12,32
ALD	5,81	3,19	5,93	3,15	4,60	5,21
ENO	3,75	2,10	3,63	3,38	6,54	3,35
GAPDH	26,40	15,05	15,15	7,15	98,57	61,81
GLDH	23,27	16,75	48,30	31,02	59,43	29,69
GOT	79,30	55,51	90,90	86,05	121,60	122,81
GPT	4,57	2,24,	9,21	5,83	17,77	15,28
ICDH	11,15	5,91	9,45	3,15	15,23	23,21
LDH	437,50	161,87	369,60	136,95	242,40	208,05
MDH	314,50	223,29	379,90	146,65	260,58	232,90
PFA	11,75	8,11	7,51	6,60	6,06	6,54
PGDH	1,79	1,07	1,33	0,68	1,43	1,13
PGK	97,60	49,78	89,90	57,57	138,57	85,64
PK	25,30	13,16	26,40	12,60	16,36	15,35
SDH	11,02	3,97	13,09	4,48	17,93	14,14
ZF	3,18	2,03	3,21	1,03	2,74	2,06
Extract-Protein mg/g	100,00	61,00	115,00	57,80	99,00	78,70

Bei der akuten CCl₄-Vergiftung nehmen während der Perfusion GDH sowie SDH und LDH am stärksten ab - um mehr als 60 % ihrer teilweise schon stark erniedrigten Ausgangswerte. Die übrigen Enzyme zeigen Abnahmen um 25 - 50 %. Der Verlust an Extrakt-Proteinen liegt mit 39 % des Ausgangsgehaltes etwa in der Mitte der Enzym-Aktivitäts-Abnahmen, so daß die spezifische Aktivität (Bezug auf Extrakt-Protein) von GLDH, MDH, PFA, ADH im Laufe der Perfusion ansteigt.

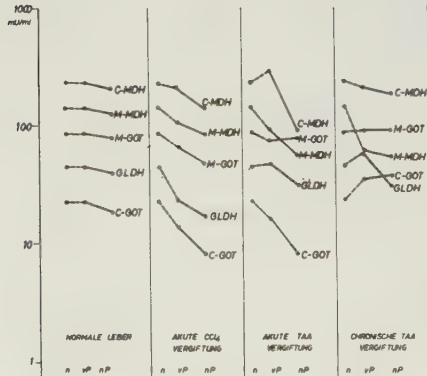
Bei der akuten TAA-Vergiftung spalten sich die Enzyme stärker in Gruppen auf (eine Gruppe von 7 Enzymen zeigt während der Perfusion Aktivitäts-Abnahmen von mehr als 60 %. Hierzu gehören außer GDH, LDH, SDH (wie bei der CCl₄-Vergiftung) auch ADH, die den stärksten Aktivitätsverlust erleidet, sowie ZF, ICDH und MDH. Die GLDH verliert etwa 1/3 ihrer Aktivität. GOT, ENO und PFA weniger als 15 %. Auch hier liegt der Verlust an Extrakt-Protein mit 42 % etwa in der Mitte der Aktivitätsabnahmen, sodaß GOT, ENO, PFA, PGK, GLDH und GPT Anstiege ihrer spezifischen Aktivitäten zeigen. Geringere Veränderungen der Enzym-Aktivitäten während der Perfusion finden sich bei der chronischen TAA-Vergiftung. Während bei der akuten Vergiftung die Verminderung der Enzym-Aktivitäten im Mittel bei 46 % liegt, sinken hier die Aktivitäten durchschnittlich nur um 20 % ab. Die stärkste Aktivitätsabnahme zeigt die ADH, dann folgen mit einer Verminderung auf etwa 50 % GLDH und ENO. Eine deutlich geringere Abnahme als bei den akuten Vergiftungen zeigt hier die GDH. Parallelen zur akuten TAA-Vergiftung lassen sich - außer bei der ADH und dem engeren Zusammengehen von GAPDH und PGK - nicht feststellen.

5.) Veränderungen der Aktivitäten der Isoenzyme von GOT und MDH bei den verschiedenen Schädigungen der Leber und während der Perfusion.

Die Ergebnisse der chromatographischen Trennung der Isoenzyme von GOT und MDH sind in Abb. 4 und Tab. IV zusammengestellt.

Abb. 4

Isoenzym-Verteilung in normalen und in vorgeschädigten Lebern vor und nach Perfusion.



Leber	C-MDH	M-MDH	% C/M	C-GOT	M-GOT	% C/M
<u>Normal</u>						
vor Perf.	233,97	143,40	62/38	22,71	85,42	21/79
nach Perf.	210,58	129,06	62/38	18,70	79,70	19/81
<u>ak. CCl₄</u>						
vor Perf.	207,88	106,62	66/34	13,88	65,42	17/83
nach Perf.	140,00	83,29	63/37	8,10	47,41	15/85
<u>ak. TAA</u>						
vor Perf.	291,76	88,14	77/23	16,27	74,63	18/82
nach Perf.	90,04	56,61	61/39	8,09	77,96	9/91
<u>CHRON! TAA</u>						
vor Perf.	200,91	59,67	77/23	34,05	87,55	28/72
nach Perf.	179,10	53,80	77/23	35,74	87,07	29/71

Bei der akuten CCl₄-Vergiftung verschiebt sich das Verhältnis der Isoenzyme der MDH gering zugunsten des cytoplasmatischen Anteils, das der GOT - ebenfalls nur wenig - entgegengesetzt. Während der nachfolgenden Perfusion verliert bei beiden Enzymen der C-Raum-Anteil mehr an Aktivität, so daß für die MDH das ursprüngliche Verhältnis von 62 % C- und 38 % M-Isoenzym nach der Perfusion nahezu wieder erreicht, die schädigungsbedingte Relations-Verschiebung der GOT jedoch weiter verstärkt wird.

Bei der akuten TAA-Vergiftung tritt eine stärkere Verarmung an M-MDH ein als bei der akuten CCl₄-Vergiftung. Sie geht bis zu einem C-/M-Verhältnis von 77 % / 23 %. Auch hier zeigt die GOT ein entgegengesetztes Verhalten:

Ihr mitochondrialer Anteil steigt, wenn auch nur gering, an. Wiederum tritt während der Perfusion vorwiegend eine Verminderung des C-Isoenzyms auf, so daß auch bei dieser Vergiftungsart nach der Perfusion die Isoenzym-Relation der normalen Leber - allerdings bei nur noch 40 % der Ausgangsaktivität an Gesamt-MDH - wieder erreicht wird. Die Isoenzym-Relation der GOT verschiebt sich bei nur wenig abnehmender Gesamt-Aktivität weiter zugunsten des M-Isoenzyms, so daß nach der Perfusion der cytoplasmatische Anteil nur noch 9 % beträgt, und die absolute Aktivität der M-GOT sogar minimal ansteigt.

Bei der chronischen TAA-Vergiftung findet sich eine deutliche Abnahme der Gesamt-MDH. Sie geht überwiegend zu Lasten des M-Isoenzyms, das sich auf wenig mehr

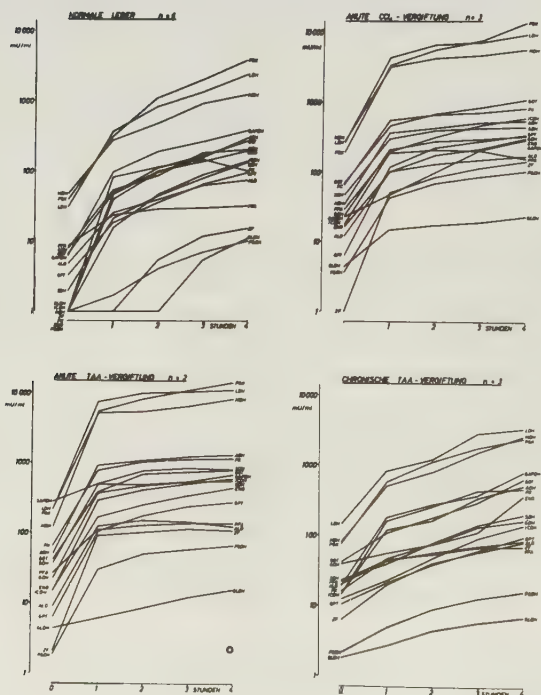
als 40 % seiner normalen Aktivität vermindert. Ebenso wie bei der akuten TAA-Vergiftung beträgt damit das Isoenzym-Verhältnis der MDH 77 % C-/ 23 % M-Isoenzym. Diese Relation wird auch während der Perfusion, die nur zu einer 10 %igen Abnahme der Gesamt-Aktivität der MDH führt, aufrecht erhalten. Anders bei der GOT: Hier tritt im Gegensatz zu den akuten Vergiftungen eine Aktivitätszunahme der Gesamt-GOT von 12 % ein, die fast ausschließlich durch die Zunahme des C-Isoenzyms bedingt ist. Dies führt zu einer Verschiebung der Isoenzym-Relation auf 28 % C-/ 72 % M-Isoenzym. Auch diese Relation ändert sich unter der Perfusion kaum. Der geringfügige Anstieg der Gesamt-Aktivität betrifft nur das cytoplasmatische Isoenzym, dessen relativer Anteil damit noch um ca. 1 % zunimmt.

6.) Enzym-Austritt in das Perfusionsmedium.

Der Anstieg der untersuchten 17 Enzyme im Perfusions-Medium während der 4-stündigen Perfusion der isolierten, durch akute Tetrachlorkohlenstoff- oder Thioacetamid-Vergiftung oder chronische Thioacetamid-Intoxikation vorgeschädigten Leber ist in Abbildung 5 dargestellt. Zum Vergleich wurde der Enzym-Austritt aus der normalen Leber unter gleichen Perfusions-Bedingungen mit aufgeführt (hier, wie in den folgenden Abbildungen und Tabellen, wurden die Veränderungen der Enzym-Aktivitäten nach dem Zellaustritt durch "Sofort-Effekt" und "Alterung" bereits rechnerisch korrigiert.

Abb. 5

Anstieg der Enzym-Aktivitäten im Perfusionsmedium
der normalen und der vorgeschädigten Lebern im
Verlauf der Perfusion.

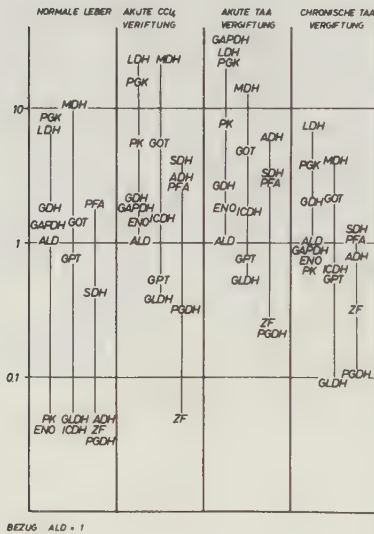


Der Überblick zeigt, daß schon bei Beginn der Perfusion der geschädigten Leber die Enzym-Aktivitäten im Medium deutlich höher liegen als bei Perfusion der normalen Leber. Bei der akuten Tetrachlorkohlenstoff-Vergiftung durchschnittlich um das 6-fache, der akuten Thioacetamid-Vergiftung sogar um das 9-fache, bei der chronischen TAA-Vergiftung um das 5-fache. Alle Enzyme sind bei den Intoxikationen von Anfang an in messbarer Aktivität im Medium vorhanden. Eine Ausnahme bildet hier allein das ZF bei der akuten Tetrachlorkohlenstoff-Vergiftung, während bei der normalen Leber 3 - 5 Minuten nach Perfusionsbeginn 7 von 17 Enzymen noch nicht exact nachgewiesen werden können.

Die Enzym-Muster, die sofort nach Perfusionsbeginn im Medium erscheinen, sind in Abbildung 6 dargestellt. Um die bei der Relationsbetrachtung störenden quantitativen Unterschiede zwischen der normalen Leber und den Vergiftungen zu eliminieren, wurde hier die Aktivität der ALD jeweils gleich 1 gesetzt und die Aktivität der übrigen Enzyme darauf bezogen.

Abb. 6

Enzym-Muster im Perfusionsmedium sofort nach Perfusionsbeginn, jeweils bezogen auf ALD gleich 1



Die Muster demonstrieren, daß nicht nur von Anfang an ein stärkerer Enzymaustritt aus den vorgeschädigten Lebern erfolgt, sondern daß sich auch deutliche Unterschiede in den Enzym-Relationen nachweisen lassen. So fallen die hohen Aktivitäten der PK wie auch der GOT, SDH, ADH und PFA bei den akuten Vergiftungen auf. Die akute TAA-Vergiftung zeichnet sich durch einen besonders hohen Anstieg der GAPDH-Aktivität aus.

Der Verlauf des Enzym-Austritts während der 4-stündigen Perfusion ist bei der chronischen TAA-Vergiftung dem der normalen Leber am ähnlichsten. Der Anstieg in den ersten Stunden ist weniger steil (auf das durchschnittlich 4-fache der erhöhten Ausgangswerte), doch ist auch in den folgenden 3 Stunden ein deutlicher Zuwachs (auf das 4-fache) zu beobachten. Die obere Gruppe der Enzyme (LDH, MDH und PGK) erreicht nach 4 Stunden etwa die Werte der normalen, nicht vorgeschädigten Leber. Die Mittelgruppe liegt hier deutlich höher und ist weiter gestreut, in der unteren Gruppe finden sich allein GLDH und PGDH.

Ein deutlich anderes Bild zeigt sich bei der akuten TAA-Vergiftung. Schon von hohen Anfangswerten ausgehend, erfolgt hier in der 1. Std. ein steiler Anstieg auf das durchschnittlich 17-fache der Ausgangsaktivität. Zu diesem Zeitpunkt haben zahlreiche Enzyme bereits das Maximum ihres Anstiegs erreicht: Während der folgenden 3 Stunden Perfusion kommt es im Durchschnitt noch nicht einmal zu einer Verdoppelung der Werte.

Die obere Gruppe der Enzyme erreicht nach 4 Stunden Aktivitäten um 10 000 mU/ml. Die Mittelgruppe ist aufgespalten, d. h. die Enzyme mit niedriger Aktivität in der Leber (PFA, ALD, ZF und PGDH) setzen sich deutlich nach unten zu ab und zwar zunehmend mit fortschreitender Dauer der Perfusion. Die GLDH, davon deutlich getrennt, steigt von ihrem relativ hohen Ausgangswert gering, aber kontinuierlich bis zum Ende der Perfusion an.

Bei der akuten CCl₄-Vergiftung zeigt sich eine größere Ähnlichkeit des Kurvenverlaufs mit der akuten TAA-Vergiftung. Auch hier finden sich hohe Ausgangswerte, von denen aus ein kräftiger Anstieg in den ersten Stunden erfolgt, allerdings nicht so hoch wie bei der akut mit TAA vorgeschädigten Leber, Dafür erfolgt in den weiteren drei Stunden der Perfusion noch einmal ein weiterer Zuwachs auf durchschnittlich reichlich das Doppelte. Die obere Gruppe der Enzyme entspricht der akuten TAA-Vergiftung, die Enzyme der Mittelgruppe liegen enger beieinander und ihre Spaltung in zwei Untergruppen ist nicht so ausgeprägt, wenn auch vorhanden. Die GLDH erreicht hier noch höhere Aktivitäten als bei der akuten TAA-Vergiftung.

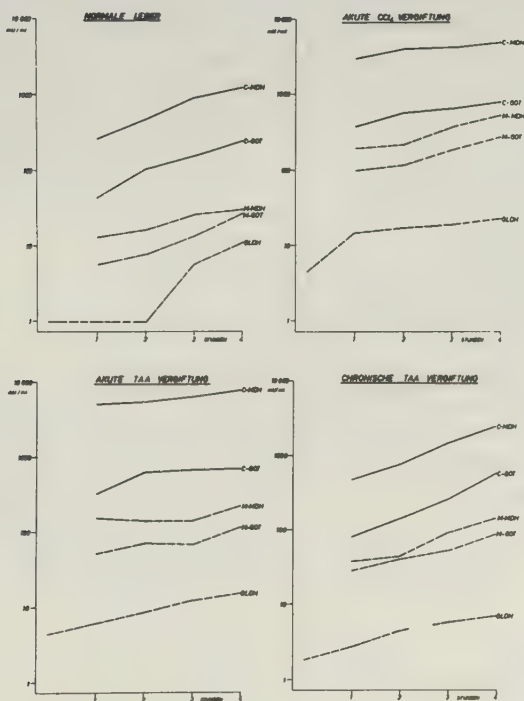
Quantitativ ist der Enzym-Austritt während der Perfusion der akut vorgeschädigten Leber durchschnittlich um den Faktor 5 höher als bei der normalen Leber.

7.) Isoenzym-Relationen im Perfusions-Medium.

Der Verlauf der Anstiegskurven der Aktivitäten von C - und M-MDH und C- und M-GOT sowie der GLDH bei Perfusion der vorgeschädigten Leber und zum Vergleich der normalen Leber ist in Abbildung 7 dargestellt.

Abb. 7

Anstieg der Aktivitäten von C- und M-MDH, C- und M-GOT und von der GLDH im Perfusionsmedium der normalen Leber und der vorgeschädigten Lebern im Verlauf der Perfusion.



Bei der akuten CCl₄-Vergiftung stieg der Anteil des M-Isoenzym der MDH von 6 auf 11 % im Laufe der Perfusion an. Sehr ähnlich ist der Verlauf bei der GOT, bei allerdings deutlich höheren M-Anteilen von 20 - 25 %. Der erste Anstieg der Gesamt-Aktivität kommt also bei beiden Enzymen überwiegend aus dem C-Raum, später steigen bei nur langsamem Zuwachs der cytoplasmatischen Anteile die M-Isoenzyme relativ stärker im Medium an. Hier zeigen sich deutliche Unterschiede zu den Befunden bei Perfusion der normalen Leber, wo zumindest der relative Anteil der M-MDH an der Gesamt-Aktivität im Laufe der Perfusion ständig geringer wird: von ca. 8 % auf etwa 2,7 %. Die Unterschiede im Verhalten der GOT-Isoenzyme sind geringer, abgesehen davon, daß die relativen Anteile an M-Isoenzym bei der normalen Leber weniger als halb so hoch sind wie bei der CCl₄-Vergiftung.

Bei der akuten TAA-Vergiftung finden sich wesentlich geringere M-Anteile der beiden Enzyme, nämlich für die MDH zwischen 2 und 3 % mit einem relativen und sogar absoluten Abfall von der 1. bis zur 3. Stunde und deutlichem Anstieg erst in der 4. Stunde. Die GOT-Relationen zeigen den gleichen Verlauf: Absinken des relativen M-Anteils von fast 14 % auf 9% bis zur 3. Stunde, dann Wiederanstieg auf den Ausgangswert. Absolut verdoppelt sich die Aktivität der M-GOT im Laufe der Perfusion, während die M-MDH nur um 1/3 zunimmt.

Die absoluten Aktivitäten der M-MDH sind bei beiden akuten Vergiftungen sehr ähnlich, die absoluten Aktivitäten der M-GOT sind dagegen bei der akuten CCl₄-Vergiftung am Ende der Perfusion mehr als doppelt so hoch wie bei der akuten TAA-Vergiftung.

Die Isoenzymrelationen bei der chronischen TAA-Vergiftung gleichen weit mehr denen der akuten CCl_4 -Vergiftung als der akuten TAA-Vergiftung. Die relativen M-Anteile der MDH variieren zwischen 5 und 7 %, die der GOT fallen allerdings kontinuierlich von 26 % auf die Hälfte ab. Die absoluten Aktivitäten der M-Isoenzyme sind entsprechend dem geringeren Anstieg der Gesamt-Aktivitäten deutlich niedriger als bei den akuten Vergiftungen, sie zeigen aber im Gegensatz zur akuten TAA-Vergiftung einen kontinuierlichen Anstieg im Laufe der Perfusion, der in etwa mit dem Anstieg der C-Isoenzyme parallel geht.

Diskussion

Das Ziel der Untersuchungen war das Studium der Frage, ob der durch eine akute Schädigung - hier die Perfusion unter Hypoxie - ausgelöste Enzym-Austritt auch bei vorgeschädigten Lebern den gleichen Gesetzmäßigkeiten folgt, die sich am gesunden Organ nachweisen lassen.

Den Zustand der zur Perfusion verwandten Lebern nach akuter Schädigung mit CCl_4 oder TAA oder chronischer Schädigung mit TAA haben wir versucht in dreierlei Hinsicht zu definieren:

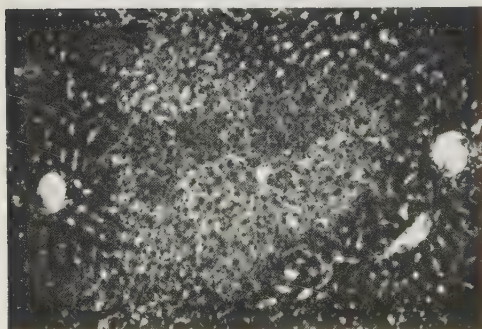
1. morphologisch
2. am Enzym-Muster des Organs vor der Perfusion
3. am Verhalten der Metabolit-Spiegel während der Perfusion.

Morphologisch zeigt sich bei der akuten CCl_4 -Vergiftung der schwerste Schaden: Bei regelrechtem Läppchen-Aufbau

findet sich ein zentrales bis intermediäres Schädigungsfeld mit zahlreichen kleinherdigen Nekrosen, hellen Zellen, Verfettung, Granulierung und feiner Siderose der Leberzellen. Es ist das nach 24 Stunden zu erwartende Bild einer subletalen CCl_4 -Vergiftung vor Beginn der Regenerations-Vorgänge.

Abb. 8

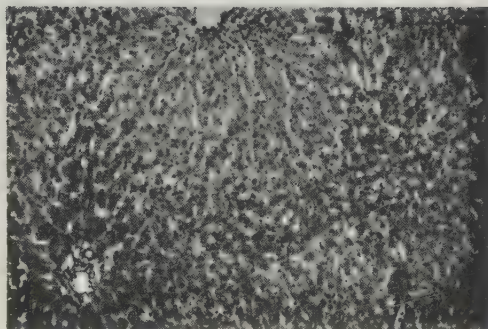
Akute CCl_4 -Vergiftung



Demgegenüber ist der geschädigte Bezirk bei der akuten TAA-Vergiftung deutlich kleiner, die Nekrosen sind nicht so häufig, es fehlen die hellen Zellen und die Siderose. Die Verfettung ist geringer, dafür fallen zahlreiche eosinophile Leukozyten in den läppchen-zentralen Bezirken auf.

Abb. 9

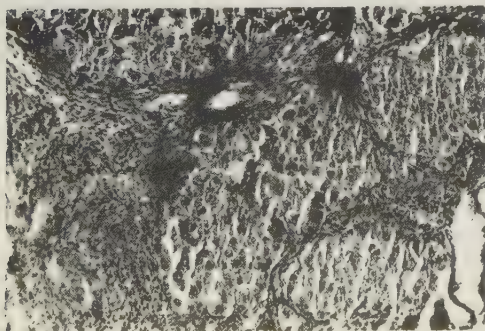
Akute TAA-Vergiftung



Ein ganz anderes Bild bietet wiederum die chronische TAA-Vergiftung, bei der es zu einer kompletten Cirrhose kommt, mit Bindegewebsvermehrung, dichter, vorwiegend rundzelliger Infiltration, Pseudoläppchenbildung, unregelmäßig verteiltem, kleinherdigem Parenchym-Schaden und leichter Verfettung.

Abb. 10

Chronische TAA-Vergiftung



Wie zu erwarten, ist das Enzym-Muster der Leber unter diesen Intoxikationen stark verändert. Bei beiden akuten Vergiftungen zeigt sich eine deutliche, unterschiedlich ausgeprägte Verminderung der "leberspezifischen" Enzyme SDH, ADH, GDH und GPT. Eine auffällige Ausnahme bildet hier der Aktivitäts-Anstieg der PFA. Deutlich vermindert sind auch die von uns untersuchten Enzyme der proportionskonstanten Gruppe der Glykolyse GAPDH, PGK, ENO. Der bei den akuten Vergiftungen gemeinsame Anstieg der PK zeigt die Sonderstellung dieses Enzyms in der Glykolyse-Kette.

Das Enzym-Muster der beiden akuten Vergiftungen unterscheidet sich deutlich von dem bei der Virus-Hepatitis des Menschen gefundenem Bild (63 - 65). Bei der Hepatitis zeigt sich ein, zumindest relativer, Anstieg aller Enzyme der Glykolyse-Kette, die Aktivität der Enzyme des HMP-Shunts ist deutlich erhöht, alle leberspezifischen Enzyme vermindert. Parallelen finden sich jedoch zwischen den Veränderungen des untersuchten Musters bei akuten tierexperimentellen Vergiftungen und den akuten toxischen Leberschäden des Menschen (Phaloidin-Vergiftung) (73). Auch bei letzteren findet sich ein deutlicher Anstieg der PFA bei fehlenden Veränderungen der Enzyme des HMP-Shunts und - wenn auch kein Abfall - so doch auch kein Anstieg der glykolytischen Enzyme.

Neben diesen Gemeinsamkeiten der beiden akuten Vergiftungen zeigen sich jedoch auch deutliche Unterschiede, die jedoch nicht - wie es das morphologische Bild erwarten läßt - gradueller Natur sind. Nur das Extrakt-Protein zeigt bei der akuten CCl_4 -Vergiftung eine stärkere Verminderung als bei der akuten TAA-Vergiftung. Das Ausmaß der Enzym-Aktivitäts-Verluste hält sich bei beiden Vergiftungen in etwa die Waage. Versucht man, in den Unterschieden der Enzym-Aktivitäts-Veränderungen bei beiden Vergiftungen Gesetzmäßigkeiten

zu erkennen, so fällt das bei dem hier untersuchten Muster schwer. Weder die Enzyme der Glykolyse, noch die des HMP- oder Citrat-Zyklus, noch - um andere Gruppierungen zu nennen - die proportionskonstanten, variablen oder die ubiquitären, im Gegensatz zu den Leberspezifischen Enzymen, zeigen gemeinsame Unterschiede zwischen beiden akuten Vergiftungen. Allein die Amino-Gruppen umsetzenden Enzyme - GOT, GPT und GLDH - sind bei der akuten TAA-Vergiftung stets höher als bei der CCl_4 -Vergiftung, die Aktivität der GLDH sogar höher als es der Norm entspricht.

Diesen auffälligen Anstieg der Amino-Transfer-Enzyme zeigt auch die chronische TAA-Vergiftung bei sonst deutlich geringer verändertem Enzym-Muster. Zwar überwiegen auch hier die Aktivitäts-Abnahmen der untersuchten Enzyme, sie sind jedoch im Durchschnitt geringer als bei den akuten Vergiftungen. Hier bleibt auch die Proportionskonstanz der Enzyme der Glykolyse-Kette erhalten.

In den deutlich geringeren Veränderungen der Enzym-Aktivitäten, der erhaltenen Proportionskonstanz der Glykolyse-Kette und in dem herausfallenden Anstieg der Aktivität der unter die Leberspezifischen Enzyme einzureihenden ADH zeigen sich Parallelen zu den Veränderungen des Enzym-Musters bei den chronischen Lebererkrankungen des Menschen (66). Durch den Anstieg der ADH-Aktivität bei der chronischen TAA-Schädigung der Ratte wird die Vermutung, daß der Anstieg dieses Enzyms bei den chronischen Leberentzündungen des Menschen auf einer Umstellung auf eine besonders kohlehydratreiche Diät zurückzuführen sei, sehr fragwürdig.

Es ist naheliegend, aus den Veränderungen des Enzym-Musters Schlüsse auf den primären Angriffspunkt der

jeweiligen Schäden zu ziehen. Mit dieser Frage haben sich bei den hier angewandten Giften vor allem die Arbeitskreise um Rees und Gallagher (24) beschäftigt. Ein solcher Versuch stößt jedoch, wie schon die unterschiedlichen Anschauungen in der Literatur zeigen, auf erhebliche Schwierigkeiten.

Während zunächst bei der akuten CCl_4 -Vergiftung der primäre Angriffspunkt in der Schädigung der Mitochondrien gesehen wurde (Christie und Judah, Dianzani 10, 15), haben spätere Untersucher in den Störungen des Mitochondrienstoffwechsels und den Veränderungen der Mitochondrienstrukturen spätere, sekundäre Schäden gesehen (16). Als primärer Angriffspunkt der Schädigung werden jetzt die Zellgrenzen und das endoplasmatische Reticulum diskutiert (Dinman, Rees und Sinha, Oberling, Heimberg) (16, 29, 49, 54) - nach Herkens (32) die microsomale Zellfraktion. Das Bild wird noch dadurch kompliziert, daß sich die Schädigung am Haupterfolgsorgan - der Leber - durch Ganglienblocker, Ausschaltung der Nebenniere und Halsmarkdurchtrennung weitgehend unterdrücken läßt (8).

Für die TAA-Vergiftung fand Gallagher in dem Einstrom von Ca^{++} (24) in die Zelle die erste nachweisbare Störung. Er betrachtet eine Permeabilitäts-Veränderung der Zellwand als primäre Noxe und erklärt die Schädigung des Zellstoffwechsels mit der durch die Kumulation des Calciums verursachten Hemmung der Energie-Erzeugung. Mit dieser Anschauung ist auch die Abschwächung der TAA-Intoxikation durch Antihistaminika gut vereinbar (Gallagher). Rees und Sinna (53) messen dem Mitochondrienschaden bei der TAA-Vergiftung größere Bedeutung bei als bei der CCl_4 -Vergiftung und glauben, daß er auch früher eintritt.⁴

Unter dem Aspekt der wesentlichen Angriffspunkte der Noxe sind vor allem die Veränderungen der bilokulären Enzyme MDH und GOT interessant.

In unserem Material ergibt sich hierbei bei allen 3 Vergiftungen eine auffallende Diskrepanz zwischen dem Verhalten der mitochondrialen und der cytoplasmatischen Isoenzyme von MDH und GOT: die M-Isoenzyme der MDH sind bei allen Vergiftungsarten um 25 - 50 % vermindert, ähnliche Verminderungen der M-GOT (Verminderung um 25 %) sind jedoch nur bei der akuten CCl_4 - Vergiftung nachweisbar, bei der akuten TAA-Vergiftung ist der Verlust nur sehr gering; bei der chronischen TAA-Vergiftung liegt die Aktivität im Normbereich. Ausgeprägter sind die Veränderungen noch bei den C-Isoenzymen: der gemeinsamen Verminderung von C-MDH und C-GOT bei der akuten CCl_4 -Vergiftung entspricht bei der akuten TAA-Vergiftung nur ein geringer Abfall der Aktivität der C-GOT, die C-MDH zeigt dagegen hier einen Anstieg um 25 % . Bei der chronischen TAA-Vergiftung wird bei geringer Abnahme der C-MDH ein starker Anstieg der C-GOT nachweisbar. Die Veränderungen der Aktivitäten der mitochondrialen GLDH verlaufen in grober Annäherung denen der M-GOT parallel.

Rees und Sinha (53) fanden 24 Stunden nach CCl_4 -Gabe Aktivitäts-Verluste der C-MDH wie auch der GLDH auf die Hälfte der Norm, bei der akuten TAA-Vergiftung eine Verminderung der GLDH-Aktivität auf 50 % bei unveränderten Aktivitäten beider MDH-Isoenzyme. Diese Differenzen zu unseren Befunden sind zumindest teilweise methodischer Natur: Rees und Mitarbeiter bestimmten nicht die Aktivitäten der Isoenzyme, sondern den jeweiligen Enzym-Gehalt in den isolierten Zell-Fractionen.

Wertet man das Ausmaß der Verminderung der mitochondrialen Enzyme und Isoenzyme als Gradmesser einer Mitochondrienschädigung, so ist diese bei der akuten

CCl_4 -Vergiftung sicherlich am größten: alle drei untersuchten M-Enzyme sind deutlich vermindert. Zugleich besteht hier, wie der Verlust an C-Isoenzymen (und anderer cytoplasmatischer Enzyme) zeigt, auch eine ausgeprägte Schädigung des cytoplasmatischen Raumes. Der Verlust an mitochondrialen Enzymen bei der akuten TAA-Vergiftung ist demgegenüber deutlich geringer, besonders, wenn man sich bei dieser Aussage vorzugsweise auf die Aktivitäten der M-GOT und GLDH stützt und der M-MDH eine Sonderstellung einräumt. Die Berechtigung zu einem solchen Vorgehen kann man aus den Befunden bei der chronischen TAA-Vergiftung ableiten, beider M-GOT und GLDH normale, bzw. sogar deutlich ansteigende Aktivitäten zeigen, während die M-MDH auch hier um 50 % vermindert ist.

Diese Divergenzen im Verhalten der einzelnen bilokulären Enzyme demonstrieren, daß die Veränderungen des Musters unter den Vergiftungen nicht nur durch einen Verlust - im Sinne des Austritts aus gestörten Strukturen - zustande kommen, sondern daß bereits bei den akuten Vergiftungen in der relativ kurzen Spanne von 24 Stunden reaktive Veränderungen des Stoffwechsels mit entsprechenden Veränderungen der Enzym-Relationen die Enzym-Muster umprägen.

Eine solche Reaktion des geschädigten Gewebes wird besonders dann verständlich, wenn in Rückblick auf die morphologischen Schädigungsbilder in Betracht gezogen wird, daß nicht homogene Zellpopulationen das Ausgangsmaterial der Gewebshomogenate zur Enzym-Bestimmung bilden, sondern daß hierin alle Schädigungsgrade von nekrotischen bis zu praktisch normalen Zellen vertreten sind.

Noch mehr tritt das Nivellierende bei der Einbeziehung größerer Areale in die Betrachtung bei den Befunden hervor, die als Ausdruck der Leistung der Gesamtleber anzusehen sind. Dies ist der Fall bei den Metabolit-Spiegeln im Extra-cellular-Raum.

Die Perfusion der normalen Leber hat gezeigt, daß trotz des Verlustes von 30 % des Extrakt-Proteins und erheblicher Enzym-Aktivitäten während mindestens 4 Stunden der Spiegel von Glucose und der L/P-Quotient im normalen Bereich gehalten werden, trotz einer vorübergehenden Senkung der Spiegel von Lactat und Pyruvat (80), die übrigens auch von Kestens (36) bei in situ mit Blut durchströmten Hundelebern, deren Enzym-Verlust außerordentlich gering war, gefunden wurde.

Daher scheint die Bestimmung dieser Metabolite geeignet, die Leistungsfähigkeit der Leber auch bei den Vergiftungen zu überprüfen.

Die Metabolitspiegel bei der Perfusion unter Hypoxie verhalten sich bei allen 3 Vergiftungen abweichend von der normalen Leber, wobei zwischen den beiden akuten Vergiftungen vorwiegend graduelle Unterschiede bestehen. Das Absinken des Glucose-Spiegels bei den akuten Vergiftungen, den man auf eine schädigungsbedingte Verarmung der Leber an Glykogen und eine ebenfalls schädigungsbedingte Abnahme der G-6-Pase-Aktivität, die von Recknagel (62) bei der CCl_4 -Vergiftung z. B. nachgewiesen wurde, zurückführen kann, ist bei der chronischen TAA-Vergiftung nicht nachzuweisen; im Gegenteil, hier stellt sich sehr bald ein auf das Doppelte erhöhter Zuckerspiegel ein.

Hingegen findet sich der Lactat-Anstieg auf das Vielfache der Ausgangswerte bei allen 3 Vergiftungen. Hieraus resultiert der erheblich erhöhte L/P-Quotient, der nur bei der CCl_4 -Vergiftung dadurch noch auf etwa dem 3-fachen der Norm eingestellt wird, daß auch das Pyruvat ansteigt.

Die geschädigten Lebern zeigen also alle eine gestörte Atmung mit vermehrtem Anfall von Wasserstoff-Ionen, die wiederum durch die Bildung von Excess-Lactat und dessen Verschiebung in den Extracellular-Raum zu eliminieren suchen. Soweit es also diese Funktion betrifft, ist ihr Verhalten relativ uniform, wenn auch, wie aus den verschiedenen Enzym-Mustern hervorgeht, es wahrscheinlich ist, daß die Stoffwechselstörung entweder an verschiedenen Punkten ansetzt oder auf unterschiedlichen Wegen zu kompensieren versucht wird. Die Tabelle V faßt den morphologischen, enzymologischen und metabolischen Status, soweit er hier untersucht wurde, bei den 3 Vergiftungen noch einmal zusammen.

Tab. V

	CCl ₄	ak. TAA	chron.° TAA
<u>A. Morphologie</u>			
Struktur	erhalten	erhalten	umgebaut
Nekrosen	zentral-in- termediär	zentral	herdförmig
Verfettung	mäßig	gering	gering
Granulierung	reichlich	mäßig	gering
Infiltration	kaum	etwas eosinophil	reichlich rundzellig
<u>B. Enzym-Aktivitäten</u>			
Allgemein	meist stark erniedrigt	meist stark erniedrigt	wenig erniedrigt, teils erhöht
Glykolyse- Enzyme	deutl.ernied. LDH erhöht	stark ernied. LDH normal	kaum ernied. LDH ernied.
HMP-Enzyme	mäßig ernied.	mäßig ernied.	deutl. ernied.
Leber-spez. Enzyme	deutl. ernied. außer PFA	wenig ernied. außer PFA	erhöht-normal außer GDH
Transami- nierende Enzyme	ernied.	gering ernied. - normal	deutl. erhöht
Mitochondria- le Enzyme	ernied.	gering ernied. - normal	stark ernied. - erhöht
<u>C. Metabolit-Spiegel</u>			
Glucose	absinkend	weniger ab- sinkend	ansteigend
Lactat	ansteigend	ansteigend	ansteigend
Pyruvat	ansteigend	fast gleich	fast gleich

Unterwirft man diese auf dreierlei Weise vorgeschädigte Leber einer zusätzlichen Noxe, wie es die hypoxische Perfusion darstellt, so wäre zu erwarten, daß nun entsprechend der Schwere und eventuell auch der Art der Vorschädigung ein unterschiedlicher Austritt von Zell-Enzymen erfolgt. Wie die Abb. 5, 6 und 7 zeigen, ist das der Fall.

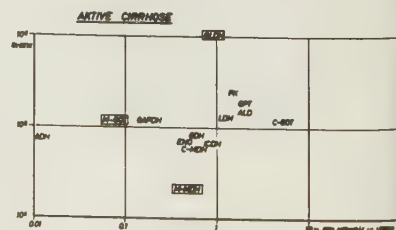
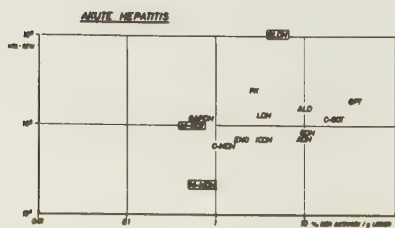
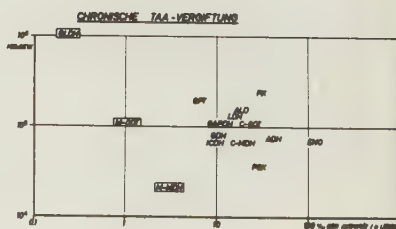
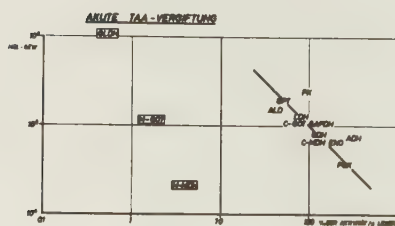
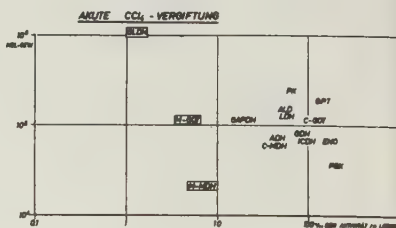
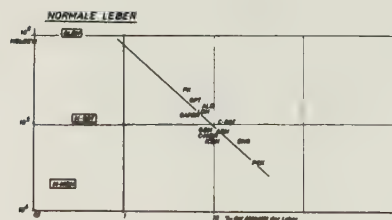
Es sind nicht nur quantitative Unterschiede, die schon sofort zu Beginn der Perfusion in Erscheinung treten und sich, zumindest bei den akuten Vergiftungen, im Fortgang weiter verstärken, sondern auch die Enzym-Relationen sind deutlich verschieden, wenn auch die grobe Gruppierung in eine große mittlere Gruppe und je eine kleinere darunter und darüber erhalten geblieben ist. Größere Differenzen finden sich im Verhalten der mitochondrialen Isoenzyme von MDH und GOT zwischen der normalen Leber und den Vergiftungen, sowie unter den Vergiftungen selbst. Dieser Anteil der M-Isoenzyme an der Gesamt-Aktivität ist immer höher als bei der normalen Leber, ganz abgesehen von der absoluten Höhe ihrer Aktivität. Damit manifestiert sich der größere Anteil von Zellen, die bereits infolge der Vorschädigung so starke Struktur-Zerstörungen erlitten haben, daß die Mitochondrien nun dem Zugriff der zusätzlichen Schädigung durch die Hypoxie erliegen.

In früheren Untersuchungen (76) wurde gezeigt, daß der Enzym-Austritt bei der hypoxischen Perfusion der normalen Leber durch 3 Faktoren bestimmt ist: Das Konzentrationsgefälle der Enzyme zwischen Leber und Kreislauf,

das Molekular-Gewicht der Enzyme und ihre intracelluläre Lokalisation. Das heißt, je höher die Aktivität eines Enzyms in der Leber und je kleiner sein Molekular-Gewicht, umso höher sein Anstieg im Perfusionsmedium, vorausgesetzt, daß nicht durch seine Lokalisation, z. B. GOT und GLDH in den Mitochondrien, sein Austritt verringert oder verzögert wird,

Abb. 11

Beziehung zwischen dem Molekulargewicht der Enzyme und ihrer Aktivität im Perfusionsmedium nach 4-stündiger Perfusion in ‰ der Aktivität/g Leber.



Es findet sich hier also eine Gesetzmäßigkeit, die von durchaus physikalischen Gegebenheiten abhängt, und die sich ebenso gut auf Zell-Bestandteile anwenden ließe, die nicht einer Steuerung durch den Stoffwechselzustand oder übergeordnete Regulationen unterworfen sind.

Von den drei genannten Faktoren ist das Molekulargewicht der Enzyme eine genetisch bedingte Konstante, die mit großer Wahrscheinlichkeit besonders durch die akute Zell-Schädigung nichtverändert wird. Dagegen treten unter der Schädigung Veränderungen der intrahepatischen Enzym-Konzentrationen und, eng damit zusammenhängend, Veränderungen der Verteilung der bilokulären Enzyme auf die Zellkompartimente auf.

Diese unterschiedliche Ausgangsbasis für den Austritt der Zell-Enzyme in den extracellulären Raum (in das Perfusionsmedium) gegenüber der normalen Leber läßt sich dadurch ausgleichen, daß man die Enzym-Aktivitäten im Perfusionsmedium auf den jeweiligen Aktivitäts-Gehalt der Leber an diesen Enzymen bezieht. Bei einem solchen Vorgehen müßten sich, wenn auch der Enzym-Austritt aus den geschädigten Lebern im Wesentlichen den an der normalen Leber gefundenen Gesetzmäßigkeiten unterliegt, auch bei Vorschädigung annähernd gleiche Relationen zwischen Molekulargewicht und Enzym-Austritt ergeben.

Die Abb. 11 zeigt das Ergebnis einer solchen Berechnung für den Enzym-Austritt aus der normalen und vorgeschädigten Ratten-Leber. Zum Vergleich wurden zwei menschliche Leber-Erkrankungen mit aufgeführt.

Schon der grobe Überblick zeigt, daß die drei Faktoren: Konzentrationsgefälle zwischen Leber und Kreislauf, Molekular-gewicht und intracelluläre Lokalisation, mit denen sich der Enzym-Austritt aus der normalen Leber gut beschreiben läßt, zur Erklärung des Enzym-Austritts aus den vorgeschädigten Lebern nicht ausreichen.

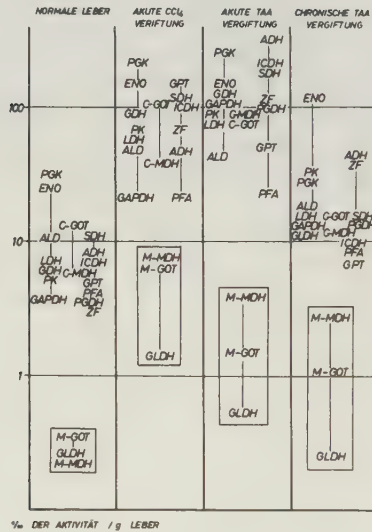
Bei allen vorgeschädigten Lebern ist nicht nur, wie zu erwarten, der Enzym-Austritt größer, also die Lage der Enzyme insgesamt auf der Abszisse nach rechts verschoben, sondern es zeigt sich auch an der wesentlich größeren Streuung über der Abszisse ein unterschiedliches Verhalten der einzelnen Enzyme in der hier erfaßten Relation zwischen intracellulärem Enzym-Verlust und extracellulärem Enzym-Anstieg. Allein bei der akuten TAA-Vergiftung ist hier noch eine gewisse Konstanz gewahrt, dabei läßt sich jedoch - wie der ansteigende Winkel der hypothetischen Enzym-Achse demonstriert, eine Abnahme der Abhängigkeit des Enzym-Austritts vom Molekulargewicht erkennen. In stärkerem Maße noch ist das auch bei den anderen Vergiftungsformen zu sehen.

Diese Unterschiede zu den Befunden bei der normalen Leber zeigen, daß sich unter der Schädigung nicht nur das Enzym-Muster der Leber verändert, und damit das Konzentrationsgefälle zum Extracellularraum, sondern daß auch der Austritt der einzelnen Enzyme aus den Zellen durch die Schädigung in unterschiedlicher, für die Schädigungsart offensichtlich relativ charakteristischer Weise verändert wird.

Ebenso wie bei der akuten CCl_4 - und der chronischen TAA-Vergiftung vermißt man auch bei den entzündlichen Lebererkrankungen des Menschen die deutliche Abhängigkeit der Enzym-Austritts-Raten von Molekulargewicht oder intrazellulärer Enzym-Konzentration. Vergleicht man die menschlichen Erkrankungen mit den experimentellen Schädigungen, so zeigt sich eine Ähnlichkeit nur mit der akuten CCl_4 -Vergiftung. Bei beiden Schädigungsformen zeichnet sich das Enzym-Muster im Extracellularraum durch die hohen Austrittsraten von GPT und C-GOT und die Umkehr ihres Aktivitätsverhältnisses aus. Letzteres wird bei der Ratte allerdings erst bei Bezug auf die Aktivität in der Leber deutlich, da die Rattenleber weniger GPT-Aktivität aufweist als die des Menschen. Der auffällig hohe Anteil an M-Enzymen in Abb. 11 bei den menschlichen Lebererkrankungen ist nicht durch einen hohen Anstieg dieser Enzyme im Serum, sondern durch die starke Verminderung ihrer Aktivität in der Leber, besonders bei der akuten Hepatitis, bedingt.

Abb. 12

Enzym-Aktivitäten im Perfusionsmedium nach 4-stündiger Perfusion der normalen Leber und der vorgeschädigten Lebern.



In der Abb. 12 sind die Austrittsraten nach 4 Stunden bei den Vergiftungen denen der normalen Leber noch einmal gegenübergestellt. Die Unterschiede werden hier

deutlich. Die akuten Vergiftungen zeigen um etwa eine Größenordnung höhere Austrittsraten, die chron. TAA-Vergiftung etwa 3-mal so hohe wie die normale Leber. Darüberhinaus sind aber auch die Unterschiede der Relationen der Enzyme untereinander erheblich.

Das wird zunächst an der sehr verschieden starken Beteiligung der mitochondrialen Enzyme am extracellulären Muster ersichtlich. Gegenüber der normalen Leber findet sich in guter Übereinstimmung mit dem morphologischen Bild bei der CCl_4 -Vergiftung der höchste Anteil, der über die akute TAA-Vergiftung zur chron. TAA-Vergiftung abfällt, aber auch dort, zumindest für M-GOT und MDH noch fast eine Größenordnung höher ist als bei der normalen Leber.

Innerhalb der Gruppen des cytoplasmatischen Raumes ist das Hervortreten der beiden Transaminasen bei der CCl_4 -Vergiftung schon erwähnt worden. Bei beiden TAA-Vergiftungen ist der relativ hohe Anstieg der ADH bemerkenswert. Ganz erheblich sind bei allen drei Vergiftungen im Vergleich zur normalen Leber die Austrittsraten des ZF und - geringer - der PGDH.

Die gleichzeitig mit dem Enzym-Austritt während der Perfusion in der Leber ablaufenden Veränderungen der Enzym-Aktivitäten stehen zu den Austrittsgrößen dieser Enzyme in keinem direktem Verhältnis. Dies wurde schon früher für die akute Hepatitis beschrieben (65).

Von den 3 Enzymen, die bei der akuten CCl_4 -Vergiftung die größten Aktivitätseinbußen während der Perfusion erleiden (LDH, GDH und SDH), zeigt nur die SDH und die GDH über dem Durchschnitt liegende Anstiege im Medium.

Die LDH verhält sich hier zwar anders als bei der akuten Hepatitis, wo zwar auch ein der hohen Aktivität in der Leber entsprechender Anstieg im Serum vermißt wird, jedoch ihre Aktivität während der Erkrankung in der Leber kaum abnimmt.

Überdurchschnittliche Anstiege im Perfusionsmedium zeigen außer SDH und GDH vor allem ENO, ICDH, GPT und PGK, die aber keineswegs größere Aktivitäts-Abnahmen in der Leber aufweisen, sondern in der großen Gruppe der cytoplasmatischen Enzyme mit Verlusten zwischen 40 und 50 % ihrer Aktivität in der Leber liegen.

Unterdurchschnittlich ist der Enzym-Anstieg im Medium der PFA, deren Aktivität in der Leber auch nur 30 % absinkt, und der mitochondrialen Enzyme, die, wie Tab. III und die Auftrennung der MDH und GOT in ihre Isoenzyme in Tab. IV zeigen, insgesamt am wenigsten Aktivität in der Leber verlieren.

Der Cytoplasmatische Raum der Leber, der während der Perfusion fast die Hälfte seiner hier untersuchten Enzyme einbüßt, und der mitochondriale Raum, der nur wenig mehr als ein Viertel seines Enzym-Bestandes zu

verlieren scheint, tragen insgesamt gesehen entsprechend zum Enzym-Anstieg im Perfusionsmedium bei, dagegen läßt sich innerhalb der Enzyme des cytoplasmatischen Raumes keine durchgehende Parallelität zwischen Abnahme in der Leber und Anstieg im Extracellularraum finden.

Bei der akuten TAA-Vergiftung, die einen gering höheren Enzym-Anstieg im Perfusionsmedium aufweist als die CCl_4 -Vergiftung, tritt der Unterschied im Verhalten der cytoplasmatischen und mitochondrialen Enzyme in der Leber noch deutlicher hervor: im Durchschnitt verliert der C-Raum mehr als die Hälfte seiner Enzyme, der M-Raum weniger als ein Viertel.

Wieder entspricht dem eine deutlich niedrigere Austrittsrate der M-Enzyme, wie es in Abb. 9 zum Ausdruck kommt.

Die Enzyme des cytoplasmatischen Raumes verhalten sich jedoch anders als bei ak. CCl_4 -Vergiftung. Bei der ak. TAA-Vergiftung wird die Stelle von LDH, GDH und SDH bei der CCl_4 -Vergiftung mit überdurchschnittlicher Abnahme in der Leber allein von der ADH eingenommen und übereinstimmend findet sich auch ein besonders hoher ADH-Anstieg im Medium.

Besonders gering fallen in der Leber außer den Aktivitäten der M-Enzyme die Aktivitäten von ENO, PFA, GPT und PGK. Von diesen zeigt allein die PFA bei der CCl_4 -Vergiftung ein gleiches Verhalten. Im Extracellularraum

ist diese Gruppe ganz uneinheitlich: PFA und GPT steigen relativ wenig an, ENO und PGK - wie bei der Perfusion der normalen Leber - stark. Hohe Austrittsraten zeigen ausserdem SDH, ZF, ICDH und GDH bei der ak. TAA-Vergiftung. Sie finden sich in der Leber nach der Perfusion noch zu etwa einem Drittel erhalten, büßen also nächst der ADH am meisten ihrer Aktivität ein. Bei der ak. TAA-Vergiftung ist die Parallelität zwischen Abnahme in der Leber und Anstieg im Extracellularraum besser ausgebildet als bei der ak. CCl_4 -Vergiftung, jedoch bleiben auch hier gänzlich unklare Widersprüche, z. B. des Verhaltens von ENO und PGK, bestehen. Da bei der akuten TAA-Vergiftung die Austrittsraten in gewisser Weise den Konzentrationsgradienten und in zweiter Linie den Molekulargewichten zu folgen scheinen, müssen für die Enzyme deren Austritt nicht mit dem Verhalten der Aktivitäten in der Leber Parallel geht, noch eher als bei der ak. CCl_4 -Vergiftung intracelluläre Abbauvorgänge einerseits, bzw. umgekehrt, demaskierende oder synthetisierende Reaktionen andererseits, auch schon in der kurzen Zeit der Perfusion diskutiert werden. Um diese Fragen aber im Einzelnen angehen zu können, ist das Versuchsmodell zu kompliziert.

Bei der chron. TAA-Vergiftung, bei der die Austrittsraten nur ein Drittel der CCl_4 -Vergiftung und ein Fünftel der akuten TAA-Vergiftung betragen, finden wir dementsprechend auch nur geringere Änderungen der Aktivitäten in der Leber. Durchschnittlich findet sich eine 20-prozentige Abnahme bei weiter Streuung von

geringer Zunahme bis zu Verlusten der Hälfte der Aktivität vor Perfusion. Zu den Enzymen, die eine starke Aktivitäts-Minderung während der Perfusion erfahren, gehören hier eigenartigerweise neben der ENO auch die ADH und die GLDH, die, wie gezeigt, im Laufe der chronischen Vergiftung eine deutliche Zunahme ihrer Aktivität erfahren hatten. Trotzdem steigt die GLDH im Perfusionsmedium nicht entsprechend ihrem Aktivitäts-Verlust in der Leber an, während ENO und ADH überdurchschnittliche Anstiegsraten zeigen. Einen ebenso hohen Austritt wie bei der ADH findet man auch beim ZF, das jedoch in der Leber nur um etwa ein Viertel während der Perfusion absinkt.

Unterdurchschnittliche Anstiegsraten zeigt außer den M-Enzymen noch die GPT, deren Verhalten sich damit noch weiter von dem bei der CCl_4 -Vergiftung entfernt als bei der akuten TAA-Vergiftung.

Die drei cytoplasmatischen Enzyme, deren Aktivitäten in der Leber während der Perfusion nicht abnehmen, sondern eher gering ansteigen, die beiden Aldolasen und die C-GOT finden sich in der Gruppe mit mittlerer Austrittsrate in den Kreislauf.

Die trotz Isolierung der Leber und Verwendung eines zellfreien Perfusionsmediums immer noch sehr komplexe Versuchsanordnung erlaubt keine Aussagen über Stoffwechsel-Änderungen oder über Einzel-Vorgänge während des Enzym-Austritts aus der vorgeschädigten Leber. Zu diesem Zwecke wäre es einerseits erforderlich, das Enzym-Muster,

das in Leber und Extracellularraum untersucht wird, vielseitiger, und mit sogenannten "Schlüsselenzymen" durchsetzt, zusammenzustellen. Zum anderen wären zur Differenzierung der zeitlichen Abläufe leichtere Schädigungen, die zu weniger massiven Veränderungen führen, besser geeignet.

Aus den vorliegenden Befunden lassen sich indessen bereits einige Schlüsse ziehen, die in der Analyse von extracellulären Enzym-Mustern wieder einen Schritt weiterführen können.

Vergleicht man die extracellulär entstehenden Enzym-Muster bei den Vergiftungen mit dem bei der normalen Leber und untereinander (Abb. 12) und bezieht in die Betrachtung die Veränderungen der Leber während der Perfusion mit ein, so sind folgende Aussagen möglich:

1. Bei gleicher Zusatzschädigung aber verschiedener Vorschädigung der Leber entstehen verschiedene Enzym-Muster im Extracellularraum.
2. Die Enzym-Muster im extracellulären Raum unterscheiden sich außer in der Höhe der Gesamt-Aktivitäten vor allem durch die unterschiedliche Beteiligung der Enzyme des mitochondrialen Raumes.
3. Da extracellulär auch die Enzyme des cytoplasmatischen Raumes ihre Relationen zueinander geändert haben, wird die bei der hypoxischen Perfusion der gesunden Rattenleber gefundene Gesetzmäßigkeit des Enzym-Austritts durch die Vorschädigung in unterschiedlicher Weise modifiziert.

Zusammenfassung

Am Modell der isolierten Rattenleber wurde untersucht, ob der Enzym-Austritt aus den Zellen bei einer akuten Schädigung durch eine akute oder chronische Vorschädigung der Leber in vivo anders verläuft als bei der normalen Leber. Drei verschiedene Schädigungen wurden mit der normalen Leber und untereinander verglichen. Als Vorschädigung dienten die akute Tetrachlorkohlenstoff-Vergiftung, die akute Thioacetamid-Vergiftung und die chronische Thioacetamid-Vergiftung.

Als akute Zusatz-Schädigung wurde die Perfusion der isolierten Rattenleber mit einem zellfreien Medium unter hypoxischen Bedingungen bei 37°C für 4 Stunden verwandt.

Zur Charakterisierung der Leber dienten das histologische Bild, ein Enzym-Muster im Lebergewebe, dessen Veränderungen durch die Vergiftungen und während der Perfusion gemessen wurden, und das Verhalten der Spiegel von Glucose, Lactat und Pyruvat im Perfusions-Medium.

Das in Leber und Perfusions-Medium untersuchte Enzym-Spektrum bestand aus folgenden Enzymen: Alkohol-Dehydrogenase, Fructose-1,6-Diphosphat-Aldolase, Enolase, Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, α -Glycerophosphat-Dehydrogenase, Glutamat-Dehydrogenase, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase, Isocitrat-Dehydrogenase, Lactat-Dehydrogenase, Malat-Dehydrogenase, Fructose-1-Phosphat-Aldolase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Kinase, Sorbit-Dehydrogenase, Zwischenferment (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase).

Die cytoplasmatischen und mitochondrialen Isoenzyme der MDH und GOT wurden durch Säulenchromatographie an DEAE-Sephadex getrennt und quantitativ bestimmt. Es zeigte sich, daß bei gleicher akuter Schädigung der Leber das extracellulär entstehende Enzym-Muster nach Vorschädigung der Leber quantitativ und qualitativ sich von dem bei der Perfusion der normalen Leber entstehenden unterscheidet.

Die bei der hypoxischen Perfusion der isolierten Leber gefundene Abhängigkeit des Enzym-Austritts von Konzentrationsgefälle Leber/Kreislauf, Molekulargewicht und intracellulärer Lokalisation ist bei der Perfusion der vorgeschädigten Lebern abgeschwächt bis nicht mehr nachweisbar.

Literatur

1. Amelung, D.

Untersuchungen zur Größe der Eliminationsgeschwindigkeit von Fermenten aus dem Kaninchen-Serum.

Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 318, 219 (1960)

2. Aydin, A. und J.E. Sokal

Uptake of plasma free fatty acids by the isolated rat liver: effect of glucagon.

Amer. J. physiol. 205, 667 (1963)

3. Bang, N.U., K. Iversen, T. Jagt and G. Tobiassen

Serum-glutamic-oxalacetic transaminase activity as an index of centrilobulär cell necrosis in cardiac and circulatory failure.

Acta med. scand. 164, 385 (1959)

4. Barthelmai, W. und R. Czok

Enzymatische Bestimmungen der Glucose in Blut, Liquor und Urin.

Klin. Wschr. 40, 585 (1962)

5. Beaufay, H., D.S. Bendall, P. Bandhuin and C. De Duve

Tissue fractionation studies. XII. Intracellular distribution of some dehydrogenases, alkaline phosphatase, desoxyribonuclease and iron in rat liver tissues.

Biochem. J. 73, 623 (1959)

6. Beisenherz, G., H.J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K.H. Garbade, E. Meyer-Ahrendt u. G. Pfeleiderer
Diphospho-fructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953)
7. Bruns, F.H. und I. Neuhaus
Die Aktivität einiger Serum- und Leberenzyme beim experimentellen CCl_4 -Schaden der Maus.
Biochem. Z. 326, 242 (1955)
8. Calvert, D.N. and T.M. Brody
Role of sympathetic nervous system in carbon tetrachloride hepatotoxicity.
Amer. J. Physiol 198, 669 (1960)
9. Christie, G.S. and J.D. Judah
Intracellular distribution of enzymes.
Proc. roy. Soc. D. 141, 420 (1953)
10. Christie, G.S. and J.D. Judah
Mechanism of action of carbon tetrachloride on liver cells.
Proc. roy. Soc. (London B) 142, 241 (1954)
11. Dach, U., E. Catterina and G. Fornaini
Enzymes of carbohydrate metabolism in the liver of patients with stomach and pancreas carcinoma.
Cancer 16, 218 (1963)

12. Delbrück, A., H. Schimmassek, K. Bartsch und Th. Bücher
Über die Verteilungsmuster von Enzymen des energie-
liefernden Stoffwechsels in Flugmuskel, Sprungmus-
kel und Fettkörper von Lokusta migratoria und ihre
cytologische Zuordnung.
Biochem. Z. 331, 273 (1958)
13. Delbrück, A., H. Schimmassek, K. Bartsch u. Th. Bücher
Enzymverteilungsmuster in einigen Organen und in
experimentellen Tumoren der Ratte und der Maus.
Biochem. Z. 331, 297 (1959)
14. De Ritis, F., M. Coltorti ed G. Giusti
Ulteriore contributo el valore daignostic ed el
significato patogenetico delle modificazioni delle
attivita transaminasiche del siero nelle epatite virale
Minerva med. 47:1, 167 (1956)
15. Dianzani, M.U.
Uncoupling of oxidative phosphorylation in mitochondria
from fatty livers.
Biochim. biophys. Acta 14, 514 (1954)
16. Dinman, B.D., E.A. Hamdi, C.F. Fox and J.W. Fragola
CCl₄-Toxicity. III Hepato-structural and enzymatic
change.
Arch. Environmental Health 7, 448 (1960)
17. Dinman, B.D., C.F. Fox, W.J. Fragola and A. Rabor
Serum enzymes and B₁₂ changes in CCl₄- hepato-toxicity.
Arch. Environmental Health 7, 630 (1963)

18. Dunn, M., J. Martins and K.R. Reissmann
The disappearance rate of glutamic oxalacetic trans-aminase from the circulation and its distribution in the body's fluid compartments and secretions.
J. Lab. clin. Med. 51, 259 (1958)
19. Figueroa, R.B. and A.P. Klotz
Alterations of liver alcohol dehydrogenase and other hepatic enzymes in alcoholic cirrhosis.
Gastroenterology 43, 10 (1962)
20. Filippa, G.
Die diagnostische Bedeutung der GLDH-Aktivität im Serum.
Enzymol. biol. clin. 3, 97 (1963)
21. Fleisher, G.A. and K.G. Wakim
The fate of enzymes in body fluids - an experimental study. I. Disappearance rates of glutamic pyruvic transaminase under various conditions.
J. Lab. clin. Med. 61, 76 (1963)
22. Fleisher, G.A. and K. G. Wakim
II. Disappearance rates of glutamic oxalacetic trans-aminase I under various conditions.
J. Lab. clin. Med. 61, 86 (1963)
23. Fleisher, G.A. and K.G. Wakim
III. Disappearance rates of glutamic oxalacetic trans-aminase II under various conditions.
J. Lab. clin. Med. 61, 98 (1963)

24. Gallagher, C.H., D.N. Gupta, J.D. Judah and K.R. Rees
Biochemical changes in liver in acute thioacetamide
intoxication.
J. Path. Bact. 72, 193 (1956)
25. Gerlach, U.
Pathologischer Übertritt von Sorbit-Dehydrogenase ins
Blut bei Lebererkrankungen.
Klin. Wschr. 35, 1144 (1957)
26. Gerlach, U.
Zur klinischen Bedeutung der Aktivitäts-Messung von
Sorbit-Dehydrogenase im menschlichen Blutserum.
Klin. Wschr. 37, 93 (1959)
27. Gerlach, U.
Pathophysiologische Grundlagen für die ärztliche Beur-
teilung von Enzymbestimmungen im Serum.
Med. Welt 740 (1964)
28. Gerlach, U.
Enzym-Diagnostik von Herz- und Leberkrankheiten in der
ärztlichen Praxis.
Fortschr. Med. 83, 755 (1965)
29. Heimberg, M., J. Weinstein, G. Dishmon and A. Dunderly^e
The action of carbon tetrachloride on the transport
and metabolism of diglycerides and fatty acids by
the isolated rat liver and its relationship to the
etiology of fatty liver.
J. biol. Chem. 237, 3623 (1962)
30. Henley, K.S., E. Schmidt and F.W. Schmidt
Serum Enzymes.
J. amer. med. Ass. 173, 977-981 (1960)

31. Henley, K.S., F.W. Schmidt and E. Schmidt
Newer diagnostic tests in liver disease.
in: Progress in Liver Disease.
Grune & Stratton, Inc., New. York (1961)
32. Herken, H., D. Maibauer und D. Neubert
Der Einfluß von Äthionin und anderen Lebergiften
auf Fermentsysteme der Lebermikrosomen.
Arch. exp. Path. Pharmacol. 233, 139 (1958)
33. Hess, B. und R. Raftopoulos
Über die Äpfelsäuredehydrogenase im menschlichen Serum,
im Liquor cerebrospinalis und anderen Körperflüssig-
keiten.
Dtsch. Arch. klin. Med. 204, 97 (1957)
34. Jennings, R.B., H.M. Sommers, G.A. Smyth, H.A. Flach
and H. Linn
Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of
a coronary artery in the dog.
Arch. path. 70, 68 (1960)
35. Kalk, H., E. Schmidt, F.W. Schmidt und E. Wildhirt
Zur Beteiligung der Leber bei der infektiösen Mono-
nukleose. Fermentaktivitätsbestimmungen in der mensch-
lichen Leber VIII.
Klin. Wschr. 38, 421 (1960)
36. Kestens, P.J.
in: La perfusion du foie isolé.
Editions Arscia S.A.,/ Librairie Maloine S.A.,
Bruxelles/Paris (1964)

37. King, D.W., M.S. Paulson, B.S. Hammaford and
A.T. Krebs
Cell death.
Amer. J. Path. 35, 369, 575, 835, 1069 (1959)
38. Lehmann, F.G. und K.W. Schneider
Die enzymatische Diagnostik des Herzinfarktes.
VI. Mitteilung: Serum-Enzym-Muster beim Herzinfarkt.
Enzymol biol. clin. 6, 66 (1966)
39. Lindner, A.
Statistische Methoden.
3. Auflage, Basel 1960, S.233 ff.
40. Massarat, S.
Enzyme kinetics, half-life and immunological
properties of iodine-131-labelled transaminase
in pig blood.
Nature 206, 508 (1965)
41. Miller, L.L., C.G. Bly, M.L. Watson and W.F. Bale
The dominant role of the liver in plasma protein
synthesis.
J. exper. Med. 94, 431 (1951)
42. Miller, L.L., W.T. Burke and D.E. Haft
Amino acid metabolism studies with the isolated
perfused rat liver - some aspects of amino acid
supplementation.
Rutgers University press, New Brunswick p. 44 (1956)
43. Mishel, M.A. and B. Morris
The gaseous metabolism of the isolated perfused
normal and choline deficient liver of rat.
J. exper. physiol. 48, 202 (1963)

44. Möhr, J., E. Schmidt, F.W. Schmidt und Ch. Herfarth
Studien zum Austritt von Zell-Enzymen am Modell der
isolierten perfundierten Rattenleber.
IV. Mitteilung: Veränderungen des Enzymaustritts unter
der Einwirkung von Desoxycholat und Dinitrophenol.
Enzymol. biol. clin. in Vorbereitung
45. Möhr, J., E. Schmidt, F.W. Schmidt und Ch. Herfarth
Studien zum Austritt von Zell-Enzymen am Modell der
isolierten perfundierten Rattenleber.
V. Mitteilung: Veränderungen des Enzymaustritts unter
der Einwirkung von Jodacetat und Kaliumcyanid.
Enzymol. biol. clin. in Vorbereitung
46. Möhr, J., E. Schmidt und F.W. Schmidt
An improved simple chromatographic method for separa-
ting isoenzymes of malic dehydrogenase and glutamic
oxalacetic transaminase.
J. Lab. clin. Med. in Vorbereitung
47. Neumeister, E., P. Otto, E. Schmidt und F.W. Schmidt
Quantitative Bestimmung der Isozyme der Malat-Dehydro-
genase, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und Lactat-
Dehydrogenase im Serum bei Lebererkrankungen.
Med. Welt 1479 (1965)
48. Nydick, J., P. Rueggsegger, F. Wroblewski and J.S. La Due
Variations in serum glutamic-oxalacetic-transaminase-
activity in experimental and clinical coronary insuf-
ficiency, pericarditis, and pulmonary infarction.
Circulation XV, 324 (1957)
49. Oberling, C. et C. Rouiller
Les effets de l'intoxication aiguë au tetrachlorure de
carbone sur le foie du rat, étude au microscope
électronique.
Ann. Anat. path. (Paris) 1, 401 (1956)

50. Ostashever, A.S., J. Gray and S. Graft
Metabolic characteristics of the isolated perfused
rat liver.
Amer. J. Physiol. 199, 395 (1960)
51. Pfleiderer, G. und E.D. Wachsmuth
Alters- und funktionsabhängige Differenzierung der
Lactat-Dehydrogenasen menschlicher Organe.
Bioch. Z. 334, 185 (1961)
52. Recknagel, R.O., and B. Lombardi
Studies of biochemical changes in sucellular particles
of rat liver and their relationship to a new hypothesis
regarding the pathogenesis of carbon tetrachloride
fat accumulation.
J. biol Chem. 236, 564 (1961)
53. Rees, K.R. and K.P. Sinha
Blood enzymes in liver injury.
J. Path. Bact. 80, 297 (1960)
54. Rees, K.R., K.P. Sinha and W. Spector
The pathogenesis of liver injury in carbon tetrachlo-
ride and thioacetamide poisoning.
J. Path. Bact. 81, 107 (1961)
55. Reith, A., J. Möhr, E. Schmidt, F.W. Schmidt und
E. Wildhirt
Isozyme und Veränderungen der Isozym-Verteilung von
Malat- und Isocitrat-Dehydrogenase und Glutamat-Oxal-
acetat-Transaminase in der normalen und pathologisch
veränderten tierischen und menschlichen Leber.
Klin. Wschr. 42, 909 (1964)
56. Savranoğlu, N., R.J. Boucek and G.G. Casten
The extent of reversibility of myocardial ischemia in
Amer. Heart J. 58, 726 (1959) dogs.

57. Schimmassek, H.
Perfusion of isolated rat liver with a semisynthetic medium and control of liver function.
Life science 11, 629 (1962)
58. Schimmassek, H.
Regulation of lactate and pyruvate levels in perfusion medium by isolated rat liver.
Life science 11, 635 (1962)
59. Schimmassek, H.
Der Einfluß der Leber auf den extracellulären Redox-Quotienten Lactat-Pyruvat. Versuche an der isolierten perfundierten Rattenleber.
Biochem. Z. 336, 468 (1963)
60. Schimmassek, H.
Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels der isolierten perfundierten Rattenleber.
Biochem. Z. 336, 460 (1963)
61. Schimmassek, H. und H.J. Mitzkat
Über eine spezielle Wirkung des Glucagons auf die Embden-Meyerhof-Kette in der Leber. Versuche an der isolierten perfundierten Rattenleber.
Biochem. Z. 337, 510 (1963)
62. Schmidt, E. and F.W. Schmidt
Determination of enzymes of the intermediary metabolism in human liver and serum.
in: Proceedings of the World Congress of Gastroenterology, William & Wilkins Co., Baltimore (1958)
63. Schmidt, E., F.W. Schmidt und E. Wildhirt
Ferment-Aktivitäts-Bestimmungen in der menschlichen Leber im Verlauf der akuten Hepatitis.
Klin. Wschr. 35, 842 (1957)

64. Schmidt, E., F.W. Schmidt und E. Wildhirt
Aktivitäts-Bestimmungen von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels in der menschlichen Leber bei der akuten Hepatitis und ihren Ausheilungszuständen.
Klin. Wschr. 36, 227 (1958)
65. Schmidt, E., F.W. Schmidt und E. Wildhirt
Aktivitäts-Bestimmungen von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels im menschlichen Serum und in Leberpunktaten bei Lebererkrankungen.
Klin. Wschr. 36, 280 (1958)
66. Schmidt, E., F.W. Schmidt und E. Wildhirt
Aktivitäts-Bestimmungen von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels bei chronischen Leberentzündungen.
Klin. Wschr. 36, 611 (1958)
67. Schmidt, E. und F.W. Schmidt
Unveröffentlichte Untersuchungen.
68. Schmidt, E. und F.W. Schmidt
Über Enzym-Muster im Serum und in menschlichen Geweben.
Europ. Symp. med. Enzymol., Milano 1960,
Verh., pp 100-118 (Karger, Basel/New York 1961)
69. Schmidt, E. und F.W. Schmidt
Zur Pathophysiologie von enzymatischen Veränderungen bei Lebererkrankungen.
in: Fortschritte der Gastroenterologie pp 302-329
Urban und Schwarzenberg, München/Berlin 1960
70. Schmidt, E. und F.W. Schmidt
Physiologische Grundlagen der Leber-Enzym-Diagnostik
Bibl. Gastroenterol. 4, 15 (1961)

71. Schmidt, E. Und F.W. Schmidt
Methode und Wert der Bestimmung der Glutamat-Dehydrogenase-Aktivität im Serum. Ein Beitrag zur Bedeutung der Untersuchung von Enzym-Relationen im Serum.
Klin. Wschr. 40, 962 (1962)
72. Schmidt, E., F.W. Schmidt u. Ch. Herarth
Isoenzyme in der menschlichen Leber und ihre intracelluläre Lokalisation. IX. Mitteilung: Fermentaktivitätsbestimmungen in der menschlichen Leber.
Klin. Wschr. 40, 1133 (1962)
73. Schmidt, E. und F.W. Schmidt
Enzym-Muster der menschlichen Leber bei Cholangitis und bei weiteren Leberschäden. XIII. Mitteilung: Fermentaktivitätsbestimmungen in der menschlichen Leber.
Klin. Wschr. 41, 649 (1963)
74. Schmidt, E., F.W. Schmidt und Ch. Herfarth
Isoenzyme in der menschlichen Leber und ihre intracelluläre Lokalisation. IX. Mitteilung: Fermentaktivitätsbestimmungen in der menschlichen Leber.
Klin. Wschr. 40, 1133 (1962)
75. Schmidt, E. und F.W. Schmidt
Enzym-Bestimmungen im Serum bei Lebererkrankungen. Funktionsmuster als Hilfsmittel der Diagnose.
Enzymol. biol. clin. 3, 1 (1963)
76. Schmidt, E. und F.W. Schmidt
Das Verteilungsmuster einiger Enzyme in der menschlichen Leber und seine Veränderung unter der Zellschädigung. III. Mitteilung zur Methodik von Enzym-Bestimmungen in menschlichen Organextrakten und im Serum.
Enzymol. biol. clin. 3, 73 (1963)

77. Schmidt, E. und F.W. Schmidt
Enzym-Muster menschlicher Gewebe als Grundlage diagnostischer Verwertung.
Regensburger Jahrbuch ärztl. Fortbildung XII. 4,
207 (1964)
78. Schmidt, E., F.W. Schmidt und H.K. Dettmar
Studien zum Austritt von Zell-Enzymen am Modell der isolierten perfundierten Rattenleber.
I. Mitteilung: zur Stabilität von Zell-Enzymen in verschiedenen zur Organ-Durchströmung geeigneten Lösungen.
Enzymol.biol. clin. in Vorbereitung
79. Schmidt, E., F.W. Schmidt, Ch. Herfarth, K.H. Dettmar und H. Fabel
Studien zum Austritt von Zell-Enzymen am Modell der isolierten perfundierten Rattenleber. II. Mitteilung: Untersuchungsmethoden und Studien über Wahl des Perfusionsmediums und der Vergleichbarkeit der Enzym-Muster verschiedener Leberlappen.
Enzymol. biol. clin. in Vorbereitung
80. Schmidt, E., F.W. Schmidt, Ch. Herfarth, K. Opitz und W. Vogell
Studien zum Austritt von Zell-Enzymen am Modell der isolierten perfundierten Rattenleber.
III. Mitteilung: Analyse des bei Perfusion unter Hypoxie entstehenden extracellulären Enzym-Musters.
Enzymol.biol.clin. in Vorbereitung
81. Sokal, J.E., LL. Miller and E.J. Sarcione
Glycogen metabolism in the isolated liver.
Amer. J. Physiol. 195, 295 (1958)

82. Vesell, E.S. and A.G. Bearn
Localisation of lactic dehydrogenase activity in
serum fractions.
Proc. Soc. exp. Biol. 94, 96 (1957)
83. Vesell, E.S. and A.G. Bearn
The heterogeneity of lactic and malic dehydrogenases.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 75, 286 (1958)
84. Wakim, K.G. and G.A. Fleisher
The fate of enzymes in body fluids - an experimental
study. IV. Relationship of the reticulo endothelial
system to activities and disappearance rates of
various enzymes.
J. Lab. clin. Med. 61, 107 (1963)
85. Warburg, O.
Wasserstoffübertragende Fermente.
Berlin 1948
86. Warburg, O. und E. Hiepler
Versuche mit Ascites-Tumorzellen.
Z. Naturforsch. 7b, 193 (1953)
87. Warburg, O., K. Gawehn und G. Lange
Über das Verhalten von Ascites Krebszellen zur
Zymohexase.
Z. Naturforsch. 9b, 109 (1954)
88. Waterlow, J.C.
Observation on enzymes in the human liver. General
considerations and preliminary results.
Acta union internationale contre le cancer 8, 704 (1957)

89. Weichselbaum, T.E.
An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma.
Amer. J. clin. Path. 10, 40 (1946)
90. Wieland, Th. und G. Pfeleiderer
Nachweis der Heterogenität von Milchsäuredehydrogenasen verschiedenen Ursprungs durch Trägerelektrophorese.
Biochem. Z. 329, 112 (1957)
91. Wolf, H.P., G. Forster und F. Leuthardt
Ein spezifischer optischer Fermenttest zum Nachweis von Parenchymschäden der Leber.
Gastroenterologia, Basel 87, 172 (1957)
92. Wüst, H., K. Ewe, K. Elster und H. Schön
Vergleich von Transaminase-Aktivität im Serum und histologischem Leberbefund bei akuten und chronischen Lebererkrankungen.
Z. Gastroenterologie 1, 47 (1963)
93. Zelman, S. and Ch.Ch. Wang
Transaminases in serum and liver correlated with liver cell necrosis in needle aspiration biopsies.
Amer. J. Med. Sci. 237, 323 (1959)
94. Zierler, K.L.
Muscle membrane as a dynamic structure and its permeability to Aldolase.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 75, 227 (1959)

Am Schluß dieser Arbeit möchte ich Frau Dr. med. E. Schmidt und Herrn Prof. Dr. med. F. W. Schmidt herzlich danken für die Überlassung des Themas, für ihren Rat und ihre Unterstützung und vor allem dafür, daß sie für mich jederzeit erreichbar waren.

Herrn Dr. med. Ch. Herfarth danke ich für die Durchführung der Leber-Isolierung zur Perfusion, Herrn Dr. H. K. Dettmar für die Berechnung der Alterung und Herrn Dr. med. K. Opitz für die histologischen Befunde.

Besonderen Dank schulde ich auch Frau K. Schmidt, Frau R. Seibke und Fräulein R. Achelis für ihre exakten Messungen.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Marburg:

Beckmann, Berendes, Braun-Falco, Bücher, Bucholz, Cleve, Deicher, Dimroth, Dölle, Drawert, du Mesnil de Rochemont, Exner, Gedigk, Göhlenhofen, Hamm, Hanack, Hartmann, Hensel, Heuser, Hildebrandt, Hornung, Jacob, Knauff, Kottmeyer, Lang, Linneweh, Löhr, Lübbers, Mahr, Martini, Marx, Mattes, Niessing, Petry, Pötschke, Rohen, Salfeld, Sauer, Schiff, Schleyer, Schmid, Schmidt, Schmitz, Schölmerich, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Straub, Vogt, Walcher, Wegerle, Wendt, Würtele,

in Innsbruck:

Günther, Halhuber, Hittmair, Huber, Lang, Rößler, Schadelbauer, Schinzel, Steiner, Tapfer,

in Berlin:

Bruntsch, Franke, Gansau, Kleberger, Oeser, Pellnitz, Schmidt.

Lebenslauf

Am 8. Dezember 1940 wurde ich als Sohn des prakt. Arztes Dr. med. Wilhelm Wrogemann und seiner Ehefrau Wilhelmine, geb. Becker, in Berlin geboren. 1947 zogen wir nach Ebstorf, Kreis Uelzen. Hier eröffnete mein Vater seine Landpraxis, und ich besuchte 4 Jahre die Volksschule. Ab Ostern 1951 ging ich zur Herzog-Ernst-Schule in Uelzen und bestand dort am 1. März 1960 die Reifeprüfung.

Das Medizinstudium begann ich im SS 1960 in Marburg, wo ich am 6.8.1962 die Ärztliche Vorprüfung bestand. Die beiden ersten klinischen Semester studierte ich in Innsbruck und Berlin. Zum WS 1963/64 kehrte ich nach Marburg zurück und begann in der Medizinischen Universitätspoliklinik unter Leitung von Prof. Dr. med. F. W. Schmidt und Dr. E. Schmidt mit experimentellen Studien über das Verhalten von Enzymen und Isoenzymen in isolierten, perfundierten Rattenlebern und deren Perfusionsmedien. Die Ergebnisse enthält die vorliegende Arbeit.

Im Anschluß an das SS 1965 meldete ich mich an der Philipps-Universität in Marburg zum medizinischen Staatsexamen.

